

항결핵제 투여후 중합효소연쇄반응으로 추적한 폐결핵 환자들의 치료반응 관찰

대구효성가톨릭대학교 의과대학 임상병리과, 내과*, 흉부외과**

전창호, 서헌석, 이상채*, 현대성*, 안옥수**

= Abstract =

Monitoring of Pulmonary Tuberculosis by Polymerase Chain Reaction After Antituberculous Treatment

Chang-Ho Jeon, M.D., Hun-Suk Suh, M.D., Sang-Chae Lee, M.D.,*
Dae-Sung Hyun, M.D.,* and Wook-Su Ahn, M.D.**

Departments of Clinical Pathology, Internal Medicine* and Cardiac Surgery**,
College of Medicine, Catholic University of Taegu Hyosung, Taegu, Korea

Background : As living and dead Mycobacteria could be amplified by polymerase chain reaction(PCR), it was considered that PCR was inappropriate for the monitoring of pulmonary tuberculosis after treatment. But we found negative conversion of PCR after successful treatment. We would like to know about the negative conversion rate of PCR and its conversion time after antituberculous treatment.

Methods : We collected 113 sputums from the 16 patients of pulmonary tuberculosis visiting Catholic University Hospital of Taegu Hyosung. We consecutively tested AFB smear, AFB culture and PCR by 2 to 4 weeks after antituberculous therapy. The patients were classified according to the chest X ray findings.

Results : We detected negative conversion of PCR from all 16 patients of the pulmonary tuberculosis within 30 weeks after treatment. The average negative conversion time was 16 ± 8 weeks. The conversion time according to the chest X-ray findings were as follows : For the 8 cases of minimum were 9 ± 5 weeks, 4 cases of moderate advanced were 20 ± 8 weeks, and 4 cases of far advanced were 23 ± 2 weeks. The product of PCR was gradually decreased according to the duration of treatment.

Conclusions : From the results of our study, we could utilize M. tuberculosis PCR for the prediction of therapy response and monitoring of the patient with pulmonary tuberculosis after treatment. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 1998, 45 : 935-941)

Key words : Pulmonary tuberculosis, Antituberculous treatment, Polymerase chain reaction, Negative conversion.

서 론

중합효소연쇄반응은 폐결핵의 진단에 유용한 검사법으로 도입되어 각 병원에서 널리 이용되고¹⁻⁵⁾ 있으나, 사균과 생균이 모두 양성으로 증폭되기 때문에^{6,7)} 결핵환자들의 경과 관찰에는 적당하지 못한 것으로 인식되고 있다. 심지어 일부에서는 결핵환자들의 진단에 중합효소연쇄반응의 결과를 신뢰하지 않는 임상적 경향^{8,9)}도 있다.

그러나 저자들은 중합효소연쇄반응 검사에서 항결핵제 투여후 음성으로 전환되는 예를 발견하였고, 이러한 결과는 환자들의 치료반응 판정에 이용할 수 있으므로, 항결핵제 투여 후 중합효소연쇄반응의 음전여부를 관찰하고, 음전된다면 그 시기를 알아보고자 하였다.

국내에서 도말양성 환자가 매년 15,000명 정도 발생하고 있고, 약제내성 결핵균에 의한 감염이 아직도 10%에 달하며, 획득내성율은 25.0%에 이르고^{10,11)}, 세계적으로도 다제내성 결핵균에 의한 산발적인 유행이 보고되고 있다¹²⁻¹⁴⁾. Rifampin 및 isoniazid 내성 결핵균을 검출하는 중합효소연쇄반응법 등이 개발되어¹⁵⁻¹⁷⁾ 결핵치료에 도움을 주고 있지만, 인체내에서 3-4가지의 약제가 복합적으로 작용되고 있는 항결핵제의 항균작용 판정에는, 아직도 임상적인 경과관찰에 의존하고 있다.

항결핵제 치료 후 중합효소연쇄반응에 의해 음전된다면, 이는 폐내에서 결핵균의 핵산이 더 이상 잔존하지 않는 것을 의미하므로, 항결핵제가 체내에서 적절한 항균작용이 일어났다고 판정할 수 있으며, 또한 치료기간에 따라 중합효소연쇄반응의 산물이 감소한다면, 1-2개월 내에 항결핵제의 감수성을 예측할 수 있으므로, 결핵환자들의 경과관찰 및 약제내성균 출현의 예방에 매우 유익하게 활용될 수 있을 것이다.

대상 및 방법

대상환자들은 1996년 12월 1일부터 1997년 10월

31일까지 대구효성가톨릭 의료원을 방문하여 흉부방사선 촬영, 항산성 염색, 균배양 및 중합효소연쇄반응 등으로 폐결핵으로 확진된 중증, 중합효소연쇄반응에서 양성이 나온 16례의 폐결핵환자들을 대상으로 항결핵제 투여후 2주-1개월 간격으로 객담을 채취하여 총 113 검체를 대상으로 하였다. 객담은 NALC-NaOH법으로 처리한 뒤¹⁸⁾ LJ배지(PML microbiologicals, Wilsonville, USA)를 이용한 균배양 및 Ziehl Neelsen법에 의한 항산성염색 등으로 추적검사를 시행하였고, 중합효소연쇄반응법은 NaOH만 처리한 뒤 DNA를 추출하여 증폭하였다. 배양된 균은 대한결핵협회에 의뢰하여 항결핵제 감수성 검사를 시행하였다.

폐결핵 환자들은 흉부 방사선을 촬영하여 폐침윤도에 따라, 경중, 중등도, 중증으로 각각 분류하였으며, 항결핵제를 투여하고 중합효소연쇄반응이 음전될 때까지 상기 3가지 검사를 첫 2개월까지는 2주간격으로, 그 후에는 4주간격으로 동시에 실시하여 추적하였고, 임상경과는 항결핵제 투여 후 1년간 관찰하였다.

결 과

추적관찰한 16례의 폐결핵환자들의 연령분포는 45 ± 20세 였으며 남자가 1.83 : 1로 많았다. 흉부방사선 소견상 경중 8례, 중등도 4례 및 중증 4례로 각각 분류하였다. 항결핵제를 투여받은 16명의 환자들은 중합효소연쇄반응법에서 모두 30주 내에 음전되었다. 각 검사방법에 따른 평균 음전 기간은 항산성 염색법 8 ± 6주, 배양법 9 ± 5주 및 중합효소연쇄반응법 16 ± 8주로 각각 나타났다(Table 1).

Fig. 1에서 치료에 반응한 환자의 중합효소연쇄반응 양상을 나타내었는데 중합효소연쇄반응 산물이 시간이 경과함에 따라 점차 감소하다가, 보이지 않게 되는 양상을 나타내었다.

방사선소견에 따른 중합효소연쇄반응의 평균 음전 기간은 경중 9 ± 5주, 중등 20 ± 8주 및 중증 23 ± 2주로 각각 나타났고, 경중인 경우는 18주 이내 모두

Table 1. Negative conversion of microbiological tests and clinical course after ant-tuberculous therapy from the patients of pulmonary tuberculosis.

Cases	Negative conversion (wk)			X-ray finding	Initial Therapy	Course
	PCR	Culture	Stain			
1	21	6	4	FA	INH, RFP, PZA, KM	Cured with 2' drug
2	22	14	14	FA	INH,RFP,PZA	Improved
3	23	8	20	FA	INH,RFP,PZA,KM	Improved
4	26	14	14	FA	INH,RFP,PZA,LVF	Cured with 2' drug
5	16	5	3	MA	INH,RFP,PZA	Cured
6	12	Neg.	Neg.	MA	INH,PZA,LVF	No visit
7	22	16	16	MA	INH,RFP,PZA	Cured with 2' drug
8	30	8	11	MA	INH,RFP,PZA	Cured
9	9	4	6	Min	INH,RFP,EB,PZA	Cured
10	6	Neg.	4	Min	INH,RFP,PZA	Cured
11	6	Neg.	2	Min	INH,RFP,EB,PZA	Not improved
12	14	14	4	Min	INH,RFP,PZA	Cured
13	6	Neg.	2	Min	INH,RFP,PZA	Improved
14	18	3	Neg.	Min	INH, RFP, PZA, LVF	Improved
15	6	Neg.	2	Min	INH, RFP, EB, PZA	Cured
16	10	Neg.	Neg.	Min	INH, RFP, PZA	Cured
Average	16±8	9±5	8±6			

FA = far advanced ; MA = moderate advanced ; Min = minimal ; INH = isoniazid ; RFP = rifampin ; PZA = pyrazinamide ; EB = etambutol ; KM = kanamycin ; LVF = levofloxacin

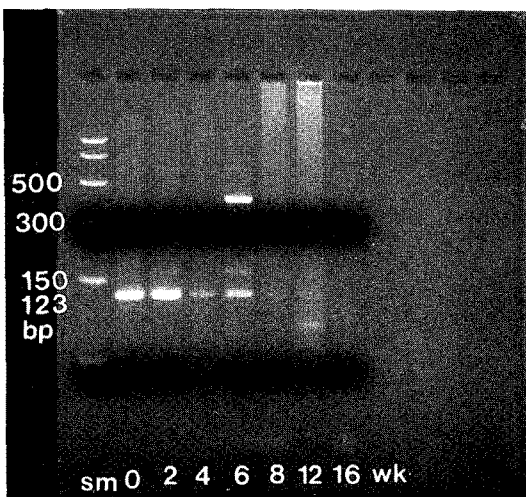


Fig. 1. Negative conversion of polymerase chain reaction after antituberculous treatment.

음전되었다(Fig. 2).

Table 2에 약제 내성과 관련된 5례의 중합효소 연쇄반응 양상을 요약하였다. 증례 1, 4 및 7의 환자들은 모두 isoniazid 및 rifampin에 내성이 관찰되어, ethambutol, prothionamide, cycloserine 및 levofloxacin 등의 2차 약제로 교체하여 각각 12주, 8주 및 6주 후에 중합효소연쇄반응에서 음전되었다. 증례 3 및 14의 2례는 과거 치료 경험자들로서 경증에 속한 증례 14는 18주의 음전기간이 소요되었다.

고 찰

항결핵제 투여후 폐결핵환자들의 객관적인 경과관찰은, 장기간 약제를 복용해야 하는 환자들의 입장에서 매우 중요한 일이다. 또한 약제내성균의 출현을 막기

Table 2. Clinical summary of the patients who had drug resistant tuberculosis or past history of tuberculosis.

Cases	PCR(-)	X-ray	Summary of clinical course
1	21wk	FA	PCR(-) after 12 wk therapy with EB,PTH,CS and LVF, cured
3	23wk	FA	30 years ago TB history(+), Improved
4	26wk	FA	PCR(-) after 8 wk therapy with EB,PTH,CS and LVF, improved
7	22wk	MA	PCR(-) after 6 wk therapy with EB,PTH,CS and LVF, cured
14	18wk	Min	11 years ago TB history(+), Improved

FA=far advanced ; MA=moderate advanced ; Min=minimal ; EB=etambutol ; PTH=prothionamide ; CS=cycloserine ; LVF=levofloxacin

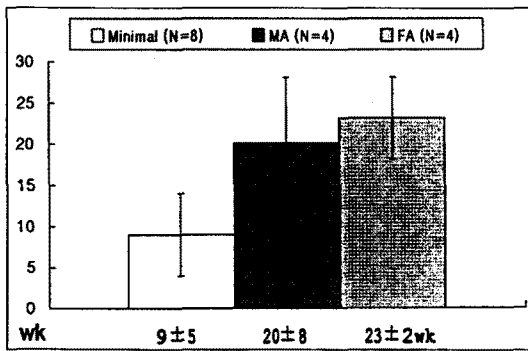


Fig. 2. Negative PCR conversion after chemotherapy according to the X-ray classification.

위해서도 사용약제의 감수성을 예측하는 일이 중요하다. 주지하는 바와 같이 현재 시행되고 있는 항결핵제의 감수성검사는 반드시 결핵균이 성장해야하고, 결과 판정까지 최소 3-4개월의 기간이 소요되므로, 내성균주에 의한 감염 예측과 내성균주 출현의 예방에는 도움이 되지 못한다.

또한 일부 임상의를 중에는 중합효소연쇄반응 결과에 대해 불신감을 갖고 있는 풍토도 있어, 중합효소연쇄반응이 결핵치료 후 음전 된다면 결핵 치료의 방침으로 확고한 위상을 수립할 수 있어 매우 고무적일 것이다.

Afghani 등은¹⁹⁾ 정량적 중합효소연쇄반응을 실시한 결과 항결핵제에 반응하는 환자들은 비반응군

에 비하여, 객담내 결핵균의 핵산이 점차적으로 감소하고 중합효소연쇄반응이 음전되는 기간도 짧아진다고 하였다. 또한 Scarpellini 등도²⁰⁾ 결핵성 뇌막염을 앓고 있는 후천성 면역결핍증 환자의 뇌척수액에서 실시한 중합효소연쇄반응이 음전되지 않는 환자들이 전신성 결핵으로 결국 사망하였다고 하였다. Yuen 등은²¹⁾ 항결핵제 치료 6개월 후, 70%의 환자들에서 중합효소연쇄반응에서 음전되며, 음전되지 않는 환자들은 다른 내과적 질환이 동반되거나, 방사선 소견상 침윤범위가 넓고, 과거 치료력 양성 혹은 약제내성균에 의한 감염 환자들이라고 보고하였다.

본 연구에서 실시한 중합효소연쇄반응법에서는 16명의 환자들 모두 30주 내에 음전되었고, 중합효소연쇄반응의 평균 음전기간은 16주로 나타났다. 방사선 소견에 따라 8례의 경증 환자들은 평균 음전기간 9주며, 75%가 10주 이내에 음전되었다. 4례의 중등 환자들은 75%에서 22주내에 음전되었고, 4례의 중증 환자들은 모두 20주에서 26주 사이에 음전되었다. 통계적으로 의미있는 결론을 내리기에는 흥부 침윤 정도에 따른 증례수가 부족하지만, 경증의 환자들은 치료 후 10주 지나, 중등 이상의 환자들은 20주 지나 중합효소연쇄반응으로 추적검사를 실시하여 결핵균의 잔존여부를 확인하는 것이 바람직 할 것이다.

항결핵제 치료 후 중합효소연쇄반응은 6개월 지

나 7%~40%^{7, 21, 22)}에서 양성으로 나타난다고 하였고, 심지어 치료 후 1년이 경과해도 30%에서 양성⁷⁾으로 나온다는 보고도 있다. 그러나 대부분의 연구에서 폐 내에서 존재하는 결핵균의 양을 시사하는 흉부 방사선 소견과의 관계가 불명확하였고, 개체의 면역상태에 따라 치료상태가 다르게 나타날 수 있으며, 환자들의 규칙적인 항결핵제 복용 여부도 확인이 되어야 하므로, 항결핵제 치료 후 중합효소연쇄반응의 음전시기에 대하여 일치하는 결과를 얻기는 어려울 것이다. 하지만 Yuen 등²¹⁾의 연구에 의하면 폐 침윤 범위가 넓을수록 중합효소연쇄반응 음전에 소요되는 기간이 오래 걸린다고 하여, 본 연구의 결과와 일치하는 결론을 얻었다. 그러므로 폐침윤 정도에 따른 증례수를 더욱 늘려, 폐침윤에 따른 중합효소연쇄반응 음전시기를 확립한다면 환자의 치료반응 판정에 큰 도움을 줄 수 있을 것이다.

Fig. 1에서 관찰한 중합효소연쇄반응 양상은 중합효소연쇄반응의 임상적 의미를 더해주고 있는데, 환자들이 치료에 반응하는 경우 증폭산물이 점차 감소되다가 보이지 않았다. 따라서 정량적 중합효소연쇄반응을 실시한다면, 2주에서 1개월 내에 항결핵제 투여 후 체내에서의 감수성 여부를 판정^{7, 23)}할 수 있을 것이다. Afghani 등²⁴⁾은 정량적 중합효소연쇄반응을 실시하여, 1주일 이내 Isonizid 내성 균주와 감수성 균주를 구분할 수 있다고 하였다. 그러나 정량적 중합효소연쇄반응을 사용하지 않는 검사실이라도 정도판리가 잘 되어있는 곳에서는, 중합효소연쇄반응 산물의 양을 객관적으로 산출하여 항결핵제에 대한 체내 감수성을 예측할 수 있을 것이다²⁵⁾.

항결핵제 치료 중 3례의 환자들은 약제내성이 관찰되었다. 이들은 항결핵제 감수성 검사에서 1차약제에 내성을 보여 3-4개월간 1차 약제 투여 후 2차약제로 교체하였는데, 2차약제를 투여후 6-12주 지나 중합효소연쇄반응에서 음전되었다. 따라서 치료 후 12주째에 중합효소연쇄반응을 실시해보는 것이, 인체 내에서 작용하고 있는 항결핵제의 감수성을 판정할 수 있

는 시점으로 사료되었다. 중등도 및 경중에 속한 과거 치료 경험자들의 각 1례는 치료 후 각 23주 및 18주 지나 음전되어, 초치료 환자들에 비하여 오랜 음전기 간 소요되었다.

본 연구의 대상 환자들은 1년간 임상경과를 추적 관찰하였으며, 경중에 속한 1례는 치료 후 6주에 중합효소연쇄반응에서 음전되었으나, 9개월 치료후 방사선 소견에서 새 병변부가 발견되어 2차 약제로 교체하였고, 더 이상 병원을 방문하지 않은 1례를 제외한 14례는 모두 임상적으로 호전되었다.

부주의한 중합효소연쇄반응으로 발생할 수 있는 위양성의 위험성으로 인하여 결과 자체에 대한 의문성이 제기되고 있는 시점에서, 본 연구에서 관찰한 16례의 100% 음전결과와, 치료기간이 경과함에 따라 중합효소연쇄반응 산물이 감소되고, 폐 침윤범위가 넓을 수록 오랜 음전기 간 소요됨은, 중합효소연쇄반응 검사법이 결핵의 진단 뿐 아니라 치료반응 관찰에 매우 유용하게 이용될 수 있음을 시사하였다. 따라서 결핵균 감염에서의 중합효소연쇄반응법은 이제 조기진단의 활용범위를 벗어나, 체내 약제내성 판정, 경과관찰 및 치료반응 예측 등으로 활용될 수 있으며, 국내 실정에 맞는 정량적 중합효소연쇄반응법을 개발하여, 객관적인 중합효소연쇄반응 산물의 측정기 필요할 것이다.

요 약

배 경 :

중합효소연쇄반응은 폐결핵의 진단에 유용한 검사법으로 도입되어 각 병원에서 널리 이용되고 있으나, 사균과 생균이 모두 양성으로 증폭되기 때문에 결핵환자들의 경과관찰에는 적당하지 못한 것으로 인식되고 있다. 그러나 항결핵제 투여후 중합효소연쇄반응 검사에서 음성으로 전환되는 예를 발견하여, 항결핵제 투여후 중합효소연쇄반응의 음전여부와 음전시기를 알아 보고자 하였다.

방 법 :

1996년 12월 1일부터 1997년 10월 31일까지 대구 효성가톨릭 의료원을 방문하여, 중합효소연쇄반응에서 양성인 16례의 폐결핵환자들을 대상으로, 항결핵제 투여하고 2주-1개월 간격으로 객담을 채취하여 총 113 검체를 대상으로 균배양, 항산성염색 및 중합효소연쇄반응법 등의 추적검사를 시행하였다. 폐결핵 환자들은 흉부 방사선 소견에 따라 분류하였고, 임상경과는 항결핵제 투여 후 1년간 관찰하였다.

결 과 :

항결핵제를 투여한 16명의 환자들은 중합효소연쇄반응법에서 모두 30주 내에 음전되었고 평균 음전기간은 16 ± 8 주였다. 대상균은 흉부상사선 소견상 경증 8례, 중등도 4례 및 중증 4례로 분류되었고, 각각의 평균 음전기간은 경증 9 ± 5 주, 중등 20 ± 8 주 및 중증 23 ± 2 주였다. 항결핵제에 감수성을 보인 예에서는 약제를 복용함에 따라 중합효소연쇄반응 산물이 점차 감소하다가 증폭되지 않는 양상을 나타내었다.

결 론 :

중합효소연쇄반응이 양성되었던 폐결핵환자들은 항결핵제 투여 후 30주 이내모두 음전되었고, 폐침윤 정도가 넓을수록 평균 음전기간이 길었으며, 항결핵제로 치료함에 따라 중합효소연쇄반응 산물이 감소되었다. 따라서 중합효소연쇄반응은 폐결핵 환자들의 치료반응 판정과 효율적인 경과 관찰에 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

1. 최철석, 김은아, 이경옥. 임상가검물에서 중합효소연쇄반응을 이용한 결핵균 진단의 평가. 대한미생물학회지, 28 : 381, 1993
2. 염양숙, 정옥연, 장숙진, 문대수, 박영진. 결핵균 검출을 위한 배양법, 항산성 염색법과 중합효소연쇄반응법간의 비교. 대한임상병리학회지, 15 : 594, 1995
3. 원영호, 오종석, 박 건, 전인기. 피부결핵환자

의 파라핀포매 조직에서 중합효소연쇄반응을 이용한 결핵균의 검출. 대한피부과학회지. 34 : 64, 1996

4. 박수성, 안병문, 김은령, 김일수, 김재중, 나유진, 박한오. 말초 혈액을 이용하여 Nested PCR 법에 의한 소아 결핵의 진단. 소아과, 40 : 841, 1997
5. 박상신, 이미애, 홍기숙. 폐외결핵 진단을 위한 중합효소연쇄반응의 임상적 유용성. 대한임상병리학회지, 17 : 79, 1997
6. De Wit D, Wootton M, Dhillon J, Mitchison DA. The bacterial DNA content of mouse organs in the Cornell model of dormant tuberculosis. Tuberc Lung Dis, 76 : 555, 1995
7. Hellyer TJ, Fletcher Tw, Bates JH, Stead WW, Templeton GL, Cave MD, Eisenach KD. Strand displacement amplification and the polymerase chain reaction for monitoring response to treatment in patients with pulmonary tuberculosis. J Infect Dis 173 : 934, 1996
8. Noordhoek GT, Kolk AH, Bjune G, Catty D, Dale JW, Fine PE, Godfrey Faussett P, Cho SN, Shinnick T, Svenson SB. Sensitivity and specificity of PCR for detection of Mycobacterium tuberculosis : a blind comparison study among seven laboratories. J Clin Microbiol 32 : 27, 1994
9. Bahrmand AR, Bakayev VV, Babaei MH. Use of polymerase chain reaction for primary diagnosis of pulmonary tuberculosis in the clinical laboratory. Scand J Infect Dis, 28 : 469, 1994
10. 보건복지부, 대한결핵협회 : 제7차 전국결핵실태조사 결과, p1-33, 서울, 1995
11. 홍영표. 우리나라 결핵-어제, 오늘, 내일. 결핵 및 호흡기질환 44 : 1, 1997
12. Frieden TR, Sterling T, Pablos-Mendez A, Kilburn JO, Cauthen GM, Dooley SW. The emergence of drug resistant tuberculosis in New York

- city. N Engl J Med 328 : 521, 1993
13. Small PM, Hopewell PC, Singh SP, Paz A, Parsonnet J, Ruston DC, Schecter GF, Daley CL, Schoolnik GK. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. N Engl J Med 330 : 1703, 1994
 14. Neville K, Bromberg A, Bromberg R, Bonk S, Hanna BA, Rom WN. The third epidemic-multidrug resistant tuberculosis. Chest 105 : 45, 1994
 15. De Beenhouwer H, Lhiang Z, Jannes G, Mijs W, Machtelinckx L, Rossau R, Traore H, Portales F. Rapid detection of rifampicin resistance in sputum and biopsy specimens from tuberculosis patients by PCR and line probe assay. Tubercle Lung Dis 76 : 425, 1995
 16. 심태선, 유철규, 한성구, 심영수, 김영환. 결핵균의 rpoB 유전자 PCR-SSCP법에 의한 Rifampicin 내성의 신속 진단. 결핵 및 호흡기질환 43 : 842, 1996
 17. Shim TS, Yoo CG, Han SK, Shim YS, Kim YW. Isoniazid resistance and the point mutation of codon 463 of *katG* gene of *Mycobacterium tuberculosis*. JKMS 12 : 92, 1997
 18. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. Manual of clinical microbiology, 6th Ed., p409, ASM press, 1995
 19. Afghani B, Lieberman JM, Duke MB, Stutman HR. Comparison of quantitative polymerase chain reaction, acid fast bacilli smear, and culture results in patients receiving therapy for pulmonary tuberculosis. Diagn Microbiol Infect Dis 29 : 73, 1997
 20. Scarpellini P, Racca S, Cinque P, Delfanti F, Gianotti N, Terreni MR et al. Nested polymerase chain reaction for diagnosis and monitoring treatment response in AIDS patients with tuberculous meningitis. AIDS 9 : 895, 1995
 21. Yuen KY, Chan KS, Chan CM, Ho PL, Ng MH. Monitoring the therapy of pulmonary tuberculosis by nested polymerase chain reaction assay. J Infect Dis 34 : 29, 1997
 22. Levee G, Glaziou P, Gicquel B, Chanteau S. Follow up of tuberculosis patients undergoing standard anti-tuberculosis chemotherapy by using a polymerase chain reaction. Res Microbiol 145 : 5, 1994
 23. Sweet-Cordero EA, Chambers Hf, Cicero-Sabido R, Santos-Preciado JL. Burden of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples can be reliably determined using a quantitative, non radioactive polymerase chain reaction assay. Tuberc Lung Dis 77 : 496, 1996
 24. Afghani B, Stutman HR. Quantitative competitive polymerase chain reaction for rapid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid. Biochem Mol Med 60 : 182, 1997
 25. Palenque E, Rebollo MJ, Garcia-Bravo M, Aguado JM. Polymerase chain reaction for assessing treatment response in patients with pulmonary tuberculosis. J Infect Dis 172 : 608, 1995