

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Recherche d'endotoxines	12
Tableau II : Activité, stabilité et différence d'activité	13

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
PREMIERE PARTIE : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	
I.GENERALITES	2
A.Historique	2
B.Rappels	2
1. Rappel clinique	2
2. Diagnostic biologique	3
C.Vaccins contre la fièvre jaune	3
1. Vaccin neurotropique français	3
2. Vaccin 17D.....	4
3. Développement de nouveaux vaccins.....	5
II.CONTRÔLE DE QUALITÉ.....	5
A. Laboratoire national de contrôle des médicaments.....	5
B. Processus de contrôle.....	6
1. Sélection des méthodes d'essais	6
2. Définition des moyens techniques et humains.....	7
3. Préparation des essais	7
4. Réalisation des essais	7
5. Rédaction du rapport d'essai et validation des résultats d'essais	8
6. Émission du rapport d'essai	8
C. La nature des contrôles : identité, activité, sécurité	8
1. Identité	8
2. Activité/stabilité	9
3. Sécurité.....	10
D. Contrôle analytique du vaccin amaril	10

DEUXIÈME PARTIE : TRAVAIL PERSONNEL

I. CADRE D'ÉTUDE	11
II. MATERIEL ET MÉTHODES	11
A. Matériel	11
B. Méthodologie.....	11
III. RESULTATS	12
A. Dosage des endotoxines	12
B. Détermination de l'activité/stabilité	12
CONCLUSION.....	14
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	15

INTRODUCTION

La fièvre jaune est une hépatonéphrite aiguë grave causée par un virus *appelé virus amaril* de la famille des *Togaviridae* et du genre *Flavivirus*.

Cette arbovirose, transmise à l'homme par la piqûre d'un moustique femelle du genre *Aedes* est classée parmi les maladies ré émergentes les plus redoutables avec une létalité de 15 à 50% [1].

Chaque année près de 500 millions de personnes sont exposées avec une mortalité de 200 000 à 30 000 décès dans le monde [1].

Ainsi elle constitue une urgence de santé publique surtout dans les pays en développement ou des épidémies ont été notées en Côte d'Ivoire, Burkina, RCA, Guinée, Sierra Leone, Cameroun entre 2000 et 2009[1].

En effet la menace demeure constante à cause du relâchement des mesures prophylactiques surtout la vaccination qui constitue l'arme prophylactique majeure.

Aussi la qualité et l'efficacité des vaccins sont souvent indexées.

Une femme est décédée après avoir reçu le vaccin contre la fièvre jaune en Mars 2015 à Seattle, suscitant une grande polémique [2].

Ainsi, il demeure incontournable de procéder au contrôle qualité du dit vaccin avant leur libération pour une meilleure sécurité vaccinale.

C'est dans ce contexte que le Laboratoire National de Contrôle des Médicaments qui est le bras technique de l'autorité de réglementation effectue le contrôle de qualité du vaccin Amaril Stabilité de l'Institut Pasteur de Dakar en vue de sa libération.

L'objectif de notre étude était d'apprécier la qualité des vaccins produits à l'Institut Pasteur de Dakar et contrôlés au Laboratoire National de Contrôle des Médicaments.

PREMIERE PARTIE : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

Rapport

gratuit.com

I. GÉNÉRALITÉS

A. HISTORIQUE

La fièvre jaune a été décrite par les Espagnols au Yucatan (Mexique) en 1648 sous le nom générique de « peste », mais le virus n'a été isolé qu'en 1927 par A. Stokes au Ghana et J. Laigret à l'Institut Pasteur de Dakar.

Le rôle vecteur de l'*Aedes* a été soupçonné par Beauperthuis en 1854 puis démontré par Carlos Finlay à Cuba en 1881 et confirmé par Walter Reed sur des « volontaires ».

En 1927, un médecin irlandais W. Stokes qui travaillait au Nigeria a essayé de découvrir l'agent de transmission sur des singes infectés, il sera par la suite atteint et meurt à Lagos. Se sachant perdu, il voulait être utile jusqu'au bout en demandant qu'il soit piqué par des *Aedes* et que son sang soit inoculé à des singes : ces deux modes d'infestation se sont montrés positifs [3].

La fièvre jaune est d'origine africaine et a atteint le continent américain avec le transport des *Aedes aegypti* lors du commerce triangulaire des esclaves [4].

B. RAPPELS

1. Rappel clinique

La forme typique débute brutalement après une incubation de trois à six jours et se déroule avec une allure cyclique comportant deux phases séparées par une courte période de rémission le troisième ou quatrième jour :

- **phase rouge ou congestive**, avec fièvre élevée, céphalées violentes, myalgies lombosacrées puis généralisées, nausées et vomissements d'abord alimentaires, puis bilieux, faciès vultueux, urines foncées
- **phase jaune ou hépatorénale**, qui s'annonce par une reprise de la fièvre et comporte un ictere qui fonce progressivement, une oligurie qui s'accompagne d'une albuminurie et peut aboutir à l'anurie, des hémorragies des muqueuses, des vomissements de sang digéré (*vomito negro*). Les

anomalies neurologiques sont constantes : anxiété, agitation ou prostration ; la survenue d'un coma et/ou de signes de localisation est de pronostic grave. L'évolution se fait soit vers la mort, généralement entre le sixième et le dixième jour, soit vers la guérison, sans séquelles et avec une immunité solide et durable.

2. Diagnostic biologique

Le diagnostic biologique repose sur :

- l'isolement du virus et son identification et/ou la mise en évidence d'antigènes viraux à partir du sang d'un malade ou d'un prélèvement d'autopsie, en se rappelant que la virémie est précoce et de courte durée, et que la fragilité du virus impose le transport des échantillons dans la glace ;
- la mise en évidence de l'apparition, puis de l'augmentation des anticorps spécifiques dans le sérum du malade au cours de la maladie ; ils apparaissent à la fin de la première semaine de la maladie et certains persistent plusieurs années ;
- la recherche de lésions histologiques pathognomoniques de la fièvre jaune sur un fragment de foie prélevé sur le cadavre (la biopsie hépatique est rigoureusement contre-indiquée chez le sujet vivant, en raison d'un risque hémorragique) ;
- la mise en évidence du virus par des techniques de biologie moléculaire [5].

C. VACCINS CONTRE LA FIÈVRE JAUNE

1. Vaccin neurotropique français

Il a été créé en 1930, mais a été à l'origine d'encéphalites post vaccinale qui ont conduites à l'interdiction du vaccin et sa fabrication fut arrêtée en 1980.

2. Vaccin 17D

Le vaccin 17D a été mis au point depuis 1930 à partir d'embryons d'œufs de poulets.

Il est composé de 2 souches 17DD et 17D-204 et se présente sous forme lyophilisée.

La température de conservation est de +2°C à +8°C, mais comme tous les vaccins lyophilisés la congélation n'est pas interdite.

➤ **Administration**

Il est administré à l'âge de 9 mois en même temps que le vaccin contre la rougeole par voie sous-cutanée à une dose de 0,5ml.

Le vaccin est exigible aux frontières pour empêcher la propagation des maladies.

➤ **Effets secondaires**

Les effets secondaires sont généralement bénins à titre de céphalées, myalgies, fièvre modérée, rougeur, douleur au point d'injection.

Il peut exister trois types de MAPI graves, mais rares qui sont la réaction d'hypersensibilité sévère (choc anaphylactique), les maladies neurologiques associées à la vaccination surtout chez les nourrissons et les maladies viscérales associées à la vaccination (18 cas ont été rapportés depuis 1996 pour 180 millions de doses globalement).

➤ **Contre-indications**

Le vaccin amaril est contre indiqué en cas de déficit immunitaire congénital ou acquis, pendant la grossesse.

Les enfants de moins de 9 mois également sont contre indiqués pour ce vaccin.

3. Développement de nouveaux vaccins

De nouveaux vaccins ont été développés contre les autres infections à *Flavivirus* c'est le cas de Chimerivax™ qui est indiqué contre la fièvre jaune et la dengue et qui est en cours de développement et dont essais cliniques sont en phase I [6].

II. CONTRÔLE DE QUALITÉ

Le contrôle de qualité est une activité dont la mission est essentiellement d'accepter ou de refuser pour l'usage prévu l'objet que l'on vient de produire, c'est-à-dire contrôler que la production, est conforme aux normes du produit.

Le contrôle se préoccupe du présent : un objet, un lot a été produit et on doit vérifier qu'il est conforme aux normes, que le dossier de fabrication et les contrôles sont complets et satisfaisants.

Ces contrôles sont réalisés en respectant les normes de la qualité, qu'il s'agisse des normes de qualité spécifiques des activités de l'unité (procédures et instructions opératoires, formulaires, rapports, protocoles analytiques et d'enregistrement qui attestent de l'exécution des activités et mémorisent les résultats obtenus) ou normes scientifiques (Pharmacopée européenne, United States Pharmacopeia (USP), British Pharmacopeia (BP)...), afin d'apporter la preuve de la qualité de ses prestations donc de la validité et de la fiabilité de ses résultats d'analyse pour être crédible au niveau international.

A. LABORATOIRE NATIONAL DE CONTROLE DES MEDICAMENTS

Le Laboratoire National de Contrôle des Médicaments (LNCM) est un établissement public de l'état créé dans l'organigramme de fin de décembre 1994, mais sa naissance effective date d'avril 1996 à la nomination d'un directeur.

Le laboratoire est chargé du contrôle technique des médicaments et travaille en collaboration avec la Direction de la pharmacie et des Médicaments.

La fonction principale du LNCM, telle que définie par le décret N° 2-72273 du 1^{er} rebia II 1394 (24 avril 1974), est d'effectuer les analyses et essais que nécessite le contrôle des médicaments, des spécialités pharmaceutiques et objets de pansement et de tout autre article destiné à l'usage de la médecine humaine et vétérinaire, ainsi que des produits parapharmaceutiques.

La division du LNCM est composée de l'unité de physico-chimie, unité de vaccins et microbiologie, unité logistique et de l'unité d'assurance qualité [7, 8,9].

B. Processus de contrôle : [10, 11,12]

L'objectif du LNCM est de contrôler les échantillons des vaccins, tout en justifiant le cheminement analytique du processus (choix des méthodes d'essais, choix du matériel scientifique et du personnel...) afin de démontrer que les actions mises en œuvre et les décisions prises sont totalement maîtrisées et qu'elles répondent aux exigences de la qualité.

L'analyse du processus de contrôle des vaccins a mis en évidence un cheminement logique en 6 étapes principales, schématisé par un logigramme et accompagné d'explications générales se rapportant à chaque étape.

1. Sélection des méthodes d'essais

L'unité des vaccins choisit des méthodes préexistantes publiées, et dans la mesure du possible, validé sur le produit fini, à partir des documents suivants :

- Les dossiers d'AMM du vaccin concerné ;
- La pharmacopée européenne ;
- Les recommandations de l'OMS (les séries de Rapport technique de l'OMS).

En général, ces méthodes d'essais doivent être validées ou leur validation doit être prouvée par l'utilisation (entre autres) de produits de référence aux caractéristiques connues.

2. Définition des moyens techniques et humains

L'unité est constituée d'un personnel d'encadrement composé du responsable du bureau vaccins, qui propose ses conclusions sur les essais réalisés, de responsables d'essais qui pilotent les essais et assurent les décisions à prendre au cours du processus, d'un personnel technique expérimenté et qualifié pour mener la réalisation des essais.

Toute personne exerçant des fonctions au sein du LNCM est soumise aux dispositions concernant le secret et la discréetion professionnels.

Le matériel est dans la mesure du possible identique à celui spécifié dans la méthode d'essai. Au niveau du matériel déjà disponible à l'unité, le responsable des essais vérifie son bon état de fonctionnement et son aptitude pour l'emploi qui lui est destiné.

3. Préparation des essais

L'analyste prépare le matériel (installation et mise en route de l'appareillage d'analyse et de mesure), les réactifs et échantillons (préparation des milieux de culture, des dilutions...) en vue de la réalisation des essais.

L'utilisation et le fonctionnement de l'équipement de mesure et d'analyse sont spécifiés dans des procédures et instructions opératoires, ces documents qualité sont rangés dans des classeurs placés à proximité de chaque poste de travail.

4. Réalisation des essais

Les essais sont réalisés selon les méthodes préconisées et toutes les données brutes qui s'y rapportent aux essais sont conservées au fur et à mesure par l'opérateur, qui les inclura dans son rapport d'analyses final.

Toutes les données brutes recueillies au cours des essais sont datées et visées par l'agent technique opérateur des essais.

5. Rédaction du rapport d'analyses et validation des résultats d'essais

L'opérateur des essais rédige le rapport récapitulatif de la totalité des essais réalisés sur l'échantillon, il y inclut tous les documents permettant d'effectuer la traçabilité de chaque essai (données brutes, formules de calculs, document de travail support écrit des méthodes d'essais employées).

La validation des résultats d'essais consiste à confirmer par examen et apport de preuves tangibles que les résultats obtenus satisfont aux critères de qualité de l'unité et aux référentiels en vigueur.

Les résultats non conformes sont toujours vérifiés et les décisions prises sont documentées.

6. Émission du rapport d'analyses

Le rapport d'essai (RE) rédigé par l'opérateur des essais et incluant tous les documents attestant de la réalisation des essais, sont transmis pour correction au responsable des essais. Celui-ci rédige ses conclusions et établit un certificat de libération du lot.

C. La nature des contrôles : identité, activité, sécurité [13, 14,15]

Les contrôles pratiqués sont adaptés à la nature du vaccin considéré et sont en fonction des ressources disponibles en matière d'essai au laboratoire. Les principaux caractères systématiquement vérifiés sont :

1. Identité

Un principe actif biologique diffère des principes actifs issus de la chimie par une plus grande masse moléculaire et une structure globale plus complexe. Il s'agit souvent de mélanges de plusieurs espèces moléculaires, pas toujours bien identifiées. Dans la plupart des cas, les essais d'activité font office d'identité.

2. Activité/stabilité

Le contrôle d'activité d'un vaccin est le reflet de son pouvoir immunogène qui, en toute rigueur, ne pourrait être vérifié que par une inoculation d'épreuve de l'agent pathogène chez des sujets vaccinés. Les contrôles d'activité peuvent mettre en œuvre des essais *in vitro* pour les vaccins viraux vivants ou des mesures de charge antigénique pour les vaccins inactivés, mais également des essais *in vivo* de vérification du pouvoir protecteur ou immunogène sur l'animal pour les vaccins viraux et bactériens.

Les vaccins vivants atténués étant souvent thermolabiles, on doit également s'assurer qu'ils ne perdent pas leur efficacité pendant le stockage, en mesurant la perte d'activité en conditions de dégradation accélérée (essai de stabilité).

3. Sécurité

La sécurité des vaccins est garantie par des contrôles de pureté du principe actif au regard de contaminants microbiens (bactéries, champignons, levures, virus...), prions, protéines et ADN cellulaire. Des essais de stérilité bactérienne et fongique (pharmacopée européenne 2.6.1., Addendum 2000), de recherche des agents viraux étrangers (pharmacopée européenne 2.6.16., Addendum 2000), dosages des endotoxines bactériennes (pharmacopée européenne 2.6.14., Addendum 2000) et des substances pyrogènes (pharmacopée européenne 2.6.8., 1997) sont entrepris systématiquement.

Pour les vaccins inactivés, on ne doit déceler aucune particule résiduelle infectieuse ou toxique pour l'homme.

Comme pour tous les autres médicaments, les vaccins peuvent être soumis à des essais pharmaco techniques caractéristiques de la forme pharmaceutique, l'étude des excipients et des conservateurs, la recherche d'impuretés, de substances apparentées ou de produits de dégradation. Ainsi, des contrôles physico-chimiques sont pratiqués, soit en routine, soit par sondage, et donnant des informations sur les

caractéristiques particulières d'une protéine pour certains vaccins. Il peut s'agir aussi de la détermination de l'osmolarité du produit, du pH, de l'humidité résiduelle dans le cas des produits lyophilisés ou de la recherche de molécules comme le conservateur, l'agent d'inactivation, l'aluminium dans les vaccins adsorbés.

D. CONTRÔLE ANALYTIQUE DU VACCIN AMARIL

Le contrôle analytique du vaccin amaril au Laboratoire national de contrôle des médicaments repose sur la détermination de l'activité et stabilité du vaccin puis sur la recherche des endotoxines bactériennes.

DEUXIÈME PARTIE : TRAVAIL PERSONNEL

I. CADRE D'ÉTUDE

Cette étude a été réalisée au sein du laboratoire de contrôle national des médicaments exactement à l'unité de vaccin.

II. MATERIEL ET METHODES

A. MATÉRIEL

Dix rapports d'essais concernant 10 lots de vaccin amaril ont été utilisés.

B. MÉTHODOLOGIE

Il s'agissait de l'exploitation des résultats obtenus à la suite d'un contrôle de qualité par dosage des endotoxines, détermination de l'activité, mais également de la stabilité des 10 lots de vaccins amarils

III. RÉSULTATS

A. dosage des endotoxines

Les résultats du dosage des endotoxines sont représentés sur le tableau ci-dessous :

Tableau I : Recherche d'endotoxines

Numéros	Dosage	IPD	LCNM	NORMES	CONCLUSION
1.	ENDOTOXINES	< 0,625	<1,25	< 5	Conforme
2.	ENDOTOXINES	< 0,621	<0,652	< 5	Conforme
3.	ENDOTOXINES	< 0,625	<1,875	< 5	Conforme
4.	ENDOTOXINES	< 0,625	<0,625	< 5	Conforme
5.	ENDOTOXINES	< 0,625	<1,875	< 5	Conforme
6.	ENDOTOXINES	< 1,25	<2,5	< 5	Conforme
7.	ENDOTOXINES	< 0,625	<0,625	< 5	Conforme
8.	ENDOTOXINES	< 0,625	<0,625	< 5	Conforme
9.	ENDOTOXINES	< 0,625	< 0,625	< 5	Conforme
10.	ENDOTOXINES	< 0,625	<0,625	< 5	Conforme

IPD : Institut Pasteur de Dakar ; LCNM : Laboratoire de Contrôle National des Médicaments. Unité: UI/dose

Le dosage des endotoxines effectué aussi bien à l’Institut Pasteur de Dakar qu’au LCNM a donné de très bons résultats pour tous les lots de vaccins.

B. détermination de l’activité/stabilité

Les résultats de la détermination de l’activité/stabilité sont représentés sur le tableau ci-dessous :

Tableau II : Activité, stabilité et différence d'activité

1.	DETERMINATION	IPD	LCNM	NORMES	CONCLUSION
1.	ACTIVITÉ à J0	4,08	4,16	< 1	Conforme
	STABILITÉ J14	3,74	3,97		
	DIFFÉRENCE D'ACTIVITÉ	0,34	0,20		
2.	ACTIVITÉ à J0	3,99	4,05	< 1	Conforme
	STABILITÉ J14	3,69	3,73		
	DIFFÉRENCE D'ACTIVITÉ	0,30	0,31		
3.	ACTIVITÉ à J0	3,91	3,99	< 1	Conforme
	STABILITÉ J14	3,64	3,42		
	DIFFÉRENCE D'ACTIVITÉ	0,27	0,56		
4.	ACTIVITÉ à J0	4,03	4	< 1	Conforme
	STABILITÉ J14	3,73	3,98		
	DIFFÉRENCE D'ACTIVITÉ	0,30	0,02		
5.	ACTIVITÉ à J0	3,79	4,15	< 1	Conforme
	STABILITÉ J14	3,46	3,85		
	DIFFÉRENCE D'ACTIVITÉ	0,33	0,31		
6.	ACTIVITÉ à J0	3,76	4,11	< 1	Conforme
	STABILITÉ J14	3,55	3,96		
	DIFFÉRENCE D'ACTIVITÉ	0,21	0,15		
7.	ACTIVITÉ à J0	4,37	4,50	< 1	Conforme
	STABILITÉ J14	4,01	3,84		
	DIFFÉRENCE D'ACTIVITÉ	0,36	0,67		
8.	ACTIVITÉ à J0	4,15	4,30	< 1	Conforme
	STABILITÉ J14	3,68	3,86		
	DIFFÉRENCE D'ACTIVITÉ	0,47	0,44		
9.	ACTIVITÉ à J0	4,07	4,15	< 1	Conforme
	STABILITÉ J14	3,67	3,89		
	DIFFÉRENCE D'ACTIVITÉ	0,4	0,26		
10.	ACTIVITÉ à J0	3,88	4,03	< 1	Conforme
	STABILITÉ J14	3,55	3,98		
	DIFFÉRENCE D'ACTIVITÉ	0,33	0,05		

Unités : Activité : log UI/dose ; Stabilité : log UFP/dose

La détermination de l'activité et stabilité a montré de très bons résultats pour tous les vaccins aussi bien à l'IPD qu'au LNCM.

CONCLUSION

La fièvre jaune est une maladie très grave et fréquente. Elle reste la première cause de mortalité chez l'homme surtout dans les pays en développement.

Résoudre ce problème constitue tout l'enjeu de la vaccinologie qui constitue la science des vaccins avec une démarche transversale et réaliste.

Elle concerne donc le laboratoire de recherche (divers domaines de la biologie, l'informatique), l'industrie pharmaceutique (production, contrôle et coût), mais aussi la politique (volontés nationales et internationales) et le droit (législatif et exécutif).

La vaccination par des vaccins de bonne qualité reste donc l'arme prophylactique majeure.

En effet, assurer la qualité, l'innocuité et l'efficacité d'un vaccin est en priorité de la responsabilité du fabricant, mais c'est à l'autorité nationale de contrôle qu'il incombe d'établir les procédures destinées à garantir que les produits sont conformes aux normes établies. L'autorité nationale de contrôle procède, de manière indépendante, à une expertise technique du lot de vaccin et à l'examen.

Les contrôles de qualité effectués par le LNCM concernaient essentiellement la vérification de l'identité, l'évaluation de l'activité du principe actif ainsi que la sécurité microbiologique du produit qui ont été tous conformes aux spécifications établies.

Ainsi le vaccin amaril 17D de l'IPD est un très bon vaccin avec une très bonne activité/stabilité et une très bonne sécurité microbiologique et peut être utilisé pour la prévention de la fièvre jaune.

**REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

- 1.** OMS .Fièvre jaune. Investigation des épidémies de fièvre jaune en Afrique.Guide opérationnel. 2008.
- 2.** <http://www.seattle.obslocal.com>. 06/09/2016 à 14heures45minutes.
- 3.** Bryan CS. Discovery of the yellow fever virus. Int J Infect Dis.1997;2:52-4.
- 4.** Patrice.B, Francine.B, Sophie.D, Nagiro.D, Paula.R. Le diagnostic de la fièvre jaune. Revue francophone des laboratoires. Vol 2011, Issue 430, pages 27-32.
- 5.** <http://www.inpes.sante.fr>. Direction Générale de la Santé de France/ Comité technique des vaccinations/Guide des vaccinations édition 2012.Le 02 Septembre 2016 à 21 heures 36 minutes.
- 6.** OMS. Fièvre jaune. Vaccins et produits biologiques-Maladies transmissibles surveillance et action. Genève 1999.
- 7.** <http://www.ifrance.com/maropharma/MEDICAMENT>. Médicament au Maroc. 25/09/16 à 22HEURES 00
- 8.** OMS. Réglementation des vaccins .S'appuyer sur les autorités de réglementation pharmaceutique existantes.
Département des vaccins et produits biologiques, OMS, Genève, 1999.
- 9.** ORGANISATION DU MINISTÈRE DE LA SANTÉ.
Décret n° 2-94-985 du 17 Joumada II 1415 (21 novembre 1994) relatif aux attributions et à l'organisation du Ministère de la Santé.
- 10.** ELSA. I. L'assurance de la qualité dans un laboratoire officiel de contrôle des Médicaments. Thèse pharm., N° 1999.
- 11.** OMS. Directives à l'intention des autorités nationales sur l'assurance de la qualité des produits biologiques. Annexe 2,Série de rapports techniques, 1992, N° 822.

12. OMS. Assurance de la qualité des produits pharmaceutiques.

Recueil de directives et autres documents : volume 1, Genève, OMS, 1998.

13. ANDRE. M. La qualité et la sécurité des vaccins : apport des méthodes génétiques et immunoenzymatiques.

Thèse de doctorat en science de la vie et de la santé, 2000, N° 25.00.15.

14. <http://www.disc.vjf.inserm.fr>. Contrôles des différents vaccins. Le 25/09/16 à 22 Heures 00

15. VIDAL 2002.

Dictionnaire des spécialités pharmaceutiques en France, Édition : Copyright by OVP 2002, p : 5.