

ISOLEMENT D'ARBOVIRUS AU CAMBODGE
A PARTIR DE MOUSTIQUES
NATURELLEMENT INFECTÉS

par

C. CHASTEL

*Médecin Commandant
Bactériologiste des Hôpitaux des Armées*

et

J. RAGEAU

*Directeur de Recherches d'Entomologie
médicale à l'Office de la Recherche
Scientifique et Technique Outre-Mer*

O. R. S. T. O. M.

Collection de Références

21 OCT. 1966

n° 10898

La plupart des enquêtes virologiques qui ont été effectuées sur des moustiques de la région orientale ont eu pour cadre des études écologiques sur le virus de l'Encéphalite japonaise. Ce virus a une distribution géographique très vaste qui part de l'Inde, englobe toute l'Asie des Moussons et s'étend au Nord jusqu'au Japon et à la Province maritime de la Sibérie. Dans le Sud-Est asiatique, l'apparition, à partir de 1954, de fièvres hémorragiques transmises par des moustiques, a donné un élan nouveau à ce type de recherches.

Au Cambodge, rien de semblable n'avait été entrepris et il existait fort peu de renseignements concernant la faune culicidienne. Avec l'aide de l'O.R.S.T.O.M. à Bondy (France), l'Institut Pasteur du Cambodge a entrepris la collecte et l'identification des moustiques de la région de Phnom-Penh, tout en commençant leur étude en temps que vecteurs potentiels d'arbovirus.

Ce travail expose les résultats d'une enquête virologique qui a duré 15 mois et a porté sur 103.267 femelles de *Culicidae*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Description des points de capture

Les captures ont eu lieu entre le 7 septembre 1964 et le 31 décembre 1965 dans quatre quartiers de Phnom-Penh, à raison de :

- 3.186 femelles à Tuol Kork (2^e quartier)
- 3.302 femelles à Tuk Laak (3^e quartier)
- 3.598 femelles au « Village Catholique » (1^{er} quartier)
- et 93.181 femelles à Chruï-Chang-War (7^e quartier).

Comme le plus fort contingent de spécimens et tous les isolements de virus proviennent de moustiques capturés à Chruï-Chang-War, nous consacrerons à ce quartier un peu plus d'attention.

Chruï-Chang-War est une presqu'île située en face de Phnom-Penh, au confluent du Mékong et du Tonlé-Sap. C'est un terrain bas où voisinent de très grands arbres, des fourrés, des bosquets de bambous et de hautes herbes, qui entourent des marécages et des prairies inondables. Une importante population

de pêcheurs et d'artisans vit le long des berges qui sont cultivées, et dans des îlots villageois disséminés. On y élève des porcs, des volailles et des bovins. La faune sauvage est abondante : singes, oiseaux, reptiles, chauves-souris, rongeurs, etc. Il s'agit donc d'un quartier à caractère suburbain très marqué.

Le « Village Catholique » lui ressemble sous certains aspects, tandis que les deux autres quartiers sont soit urbanisés, soit en voie d'urbanisation.

Le climat de Phnom-Penh a été décrit précédemment (5). Il est de type équatorial, avec une saison des pluies qui débute en mai et se termine à la mi-novembre. Les précipitations comportent deux minima et deux maxima dont le second, en octobre, est le plus important.

2. Capture et acheminement des spécimens

Les moustiques ont été récoltés manuellement par un ou plusieurs « captureurs » travaillant entre 17 et 19 heures. Ils opéraient à l'intérieur et à l'extérieur d'habitations de type traditionnel, ainsi que dans leurs dépendances immédiates, qui abritent des animaux domestiques. Les moustiques étaient conservés vivants dans des tubes jusqu'au lendemain matin. Ils étaient alors acheminés vers le laboratoire pour y être tués par congélation, en plaçant les tubes à -20° C.

3. Identification et état physiologique des moustiques

Après décongélation, les femelles étaient identifiées, rassemblées en lots de même espèce, contenant de quelques individus à 250 environ. Elles étaient alors congelées à -20° C jusqu'à leur préparation en vue de l'inoculation. Un grand nombre de spécimens étaient gorgés.

4. Préparation des suspensions de moustiques

Deux techniques ont été utilisées successivement :

Du 9 septembre 1964 au 11 octobre 1965, 65.024 spécimens ont été traités par la méthode de ROBIN et col. (24) qui fait intervenir une purification partielle par le Fréon 113. Toutefois, la température de conservation des lots et des suspensions de moustiques était -20° C au lieu de -50° C dans la technique originale.

Du 16 août 1965 au 31 décembre 1965, 38.243 spécimens ont été préparés par une technique plus simple. Ils ont été broyés dans un mortier refroidi, mis en suspension dans du liquide de Hanks contenant 10 p. 100 de sérum de veau (Sorga) et des antibiotiques. Les volumes de diluant et la concentration en antibiotique étaient : 1 ml de diluant par fraction de 50 moustiques ou moins, et 1.000 U de Pénicilline et 500 μ g de Streptomycine par ml de diluant. Le broyat était centrifugé à 10.000 t/m pendant 30 minutes en centrifugeuse réfrigérée. Le surnageant était utilisé pour les inoculations, puis congelé à -20° C, en vue d'un réisolement éventuel. La stérilité du surnageant est à peu près la même dans les deux techniques.

Du fait des conditions précaires de conservation (-20° C), les suspensions de moustiques ont été inoculées le plus tôt possible après les captures.

5. Inoculation au souriceau - Adaptation - Réisolement

Chaque suspension de moustiques a été inoculée à une portée de 6 souriceaux âgés de 24-48 heures. Chacun d'eux recevait 0,02 ml par voie intra-

cérébrale (IC). Ils étaient examinés deux fois par jour pendant 10 jours, puis une fois par jour pendant 8 jours. Les animaux malades ou, à défaut, ceux qui étaient trouvés morts, étaient recueillis ; leur cerveau était prélevé et passé, à la dilution 10^{-2} , à deux autres portées de 6 souriceaux (voie IC). Il n'a pas été fait de passages aveugles systématiques, mais les indications de passage ont été très larges. L'adaptation au souriceau a été conduite comme décrit précédemment (5, 6), avec contrôles histologique et bactériologique à chaque passage, jusqu'à l'obtention d'une hémagglutinine suffisamment puissante [antigène aqueux alcalin traité par le sulfate de protamine (10) ou antigène-Fréon (22)]. Pour chaque souche, le réisolement a été tenté sur deux portées de 6 souriceaux, avec, éventuellement, passages aveugles.

6. Identification des virus

Elle a été réalisée par deux méthodes, l'inhibition croisée de l'hémagglutination pour toutes les souches, et l'inhibition des plages en cultures cellulaires pour les virus capables d'en former.

a) VIRUS DE RÉFÉRENCE

Les virus Chikungunya (TH 35), Dengue type I (Hawaii), Dengue type 2 (New Guinea B), Dengue type 3 (H 87), Dengue type 4 (H 241), Encéphalite japonaise (Nakayama), West Nile (Egypt 101), proviennent du laboratoire des virus de la Fondation Rockefeller (Docteur J. CASALS) et le virus Langat (TP 21) du Seato Laboratory à Bangkok (Major S.B. HALSTEAD). Nous utilisons pour les désigner les abréviations suivantes : TH 35, D 1, D 2, D 3, D 4, JE, WN et TP 21.

b) IMMUNS-SÉRUMS

Ils ont été préparés chez le lapin selon la technique que nous avons décrite précédemment et qui comporte une ou deux injections IC de chacun des virus de référence ou du virus à identifier (5, 8).

c) INHIBITION DE L'HÉMAGGLUTINATION

Elle a été conduite selon la technique de CLARKE et CASALS (10).

d) INHIBITION DES PLAGES EN CULTURES DE FIBROBLASTES EMBRYONNAIRES DE POULET PAR LA MÉTHODE DES DISQUES

Cette technique a été décrite précédemment à propos de l'identification du virus de la CML (7) et pour la mise en évidence du pouvoir neutralisant des sérums de reptiles vis-à-vis des virus Chik, JE, WN et TP 21 (9). En ce qui concerne l'identification de souches fraîchement isolées, le tapis cellulaire est inoculé avec 200 à 1.000 PFU du virus inconnu et, après 3 heures de contact à 37° C, on coule le milieu de recouvrement (9). Une fois que celui-ci est solidifié, on dispose à sa surface des disques de papier filtre chargés avec chacun des immuns-sérums de référence (0,025 ml). La lecture est faite au moment de l'apparition des plages et le lendemain. La positivité de la réaction est exprimée par le diamètre, en mm, de la zone d'inhibition qui est observée autour des disques.

RÉSULTATS

Les détails concernant les espèces étudiées et le nombre de spécimens inoculés sont rassemblés dans le tableau 1. En tout, 103.267 femelles appartenant à 6 genres et 28 espèces, ont été inoculées, au souriceau en 650 lots. Ce travail a permis l'isolement de 7 souches d'arbovirus dont 6 appartiennent au groupe sérologique B et une au groupe A.

TABLEAU 1

Espèce	Nombre de spécimens collectés	Nombre de lots inoculés	Nombre de souches isolées
<i>Anopheles (Anopheles) barbirostris</i> v.d. Wulp 1884	1.853	20	
<i>Anopheles (Anopheles) sinensis</i> Wiedemann 1828	234	4	
<i>Anopheles (Cellia) aconitus</i> Dönitz 1902	54	2	
<i>Anopheles (Cellia) jamesii</i> Theo. 1901	687	6	
<i>Anopheles (Cellia) sundaicus</i> Rodenwald 1925	204	3	
<i>Anopheles (Cellia) vagus</i> Dönitz 1902	2.746	19	
<i>Mansonia (Mansonioides) annulifera</i> Theo. 1901	1.485	13	
<i>Mansonia (Mansonioides) indiana</i> Edw. 1930	3.508	29	
<i>Mansonia (Mansonioides) uniformis</i> Theo. 1901	9.509	52	
<i>Aedeomyia catasticta</i> Knab 1909	10	1	
<i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> L.	10.359	71	1
<i>Aedes (Stegomyia) albopictus</i> Skuse 1894	170	8	
<i>Aedes (Aedimorphus) mediotineatus</i> Theo. 1901	390	4	
<i>Aedes (Aedimorphus) alboscuteUlatu</i> Theo. 1905	1.511	12	
<i>Aedes (Neomelaniconion) lineatopennis</i> Ludlow 1905 ..	2.285	19	
<i>Armigeres (Armigeres) kuchingensis</i> Edw. 1915	981	14	
<i>Armigeres (Armigeres) moultoni</i> Edw. 1914	7	2	
<i>Armigeres (Armigeres) subalbatu</i> Coquillett 1898	3	1	
<i>Culex (Lutzia) fuscatus</i> Wied. 1820	123	2	
<i>Culex (Neoculex) brevialpis</i> Giles 1902	85	2	
<i>Culex (Neoculex) tenuialpis</i> Giles 1924	536	7	
<i>Culex (Lophoceraomyia)</i> sp.	1.266	11	
<i>Culex (Culex) bitæniorhynchus</i> Giles 1901	744	9	
<i>Culex (Culex) gelidus</i> Théo. 1901	6.693	39	1
<i>Culex (Culex) pipiens fatigans</i> Wied. 1828	17.294	92	
<i>Culex (Culex) sitiens</i> Wied. 1828	199	3	
<i>Culex (Culex) tritæniorhynchus</i> Giles 1901	35.828	182	5
<i>Culex (Culex) visnhui</i> Théo. 1901	4.503	23	
TOTAUX	103.267	650	7

1. Caractère des souches isolées

La souche M 390 isolée d'*Aedes aegypti* (L.) et la souche M 406 provenant de *Culex gelidus* Theobald, 1901, possèdent à l'isolement les caractères propres aux virus de la dengue ; incubation longue, pouvoir pathogène faible pour la souris adulte, histopathologie caractéristique, absence de formation de plages en cultures de fibroblastes embryonnaires de poulet. Les paramètres d'activité de leurs hémagglutinines sont : pH 6,2 à 4° C pour M 390 et pH 6,0 à 4° C pour M 406.

Les souches M 593, M 613, M 632 et M 642, toutes isolées de *Culex tritaeniorhynchus* Giles, 1901, ont une incubation courte et sont très pathogènes pour la souris adulte qu'elles tuent en 5 à 13 jours, par encéphalite. Elles donnent des plages en cultures de fibroblastes embryonnaires de poulet, qui ont 4 à 6 mm de diamètre et apparaissent en 3 jours. Les paramètres des hémagglutinines sont : pH 6,6 à 37° C pour M 593 et M 613, pH 6,5 à 27° C pour M 632 et pH 6,5 à 37° C pour M 642.

La souche M 603, isolée également de *C. tritaeniorhynchus*, présente chez le souriceau inoculé par voie IC une incubation courte (48 h à 3 jours) et, avec des dilutions faibles de virus, un phénomène d'auto-interférence. Elle n'est pas pathogène pour la souris adulte, par voie IC. En cultures cellulaires, elle forme en 48 h des plages qui ont 1 mm de diamètre. L'histologie de l'encéphalite qu'elle provoque chez le souriceau ressemble à celle qui a été décrite pour les souches cambodgiennes du virus Chikungunya (5) avec, toutefois, des hémorragies moins marquées. Une hémagglutinine, de titre faible (1/20 pour pH 6,0 à 4° C) n'a été obtenue qu'au 9^e passage. Il s'agissait d'un antigène-Fréon.

Les souches M 390, M 406 et M 642 n'ont pu être réisolées, en dépit de nombreux passages aveugles. Les quatre autres souches l'ont été facilement (tableau 2).

TABLEAU 2

Souche	Isolée de	Nbre de spécimens	Dates de capture	Etat physiologique	Réisolement		Identification
					Résultat	Conservation	
M 390	<i>A. aegypti</i>	200	27/4 - 6/5/65	Non gorgés	0	36 j.	Dengue type 1
M 406	<i>C. gelidus</i>	235	14 - 20/5/65	gorgés	0	21 j.	Dengue type 1
M 593	<i>C. tritaeniorhynchus</i>	201	20 - 22/9/65	gorgés	+	18 j.	Encéphalite japonaise
M 603	<i>C. tritaeniorhynchus</i>	204	28 - 29/9/65	gorgés	+	10 j.	Getah
M 613	<i>C. tritaeniorhynchus</i>	237	5/10/65	gorgés	+	13 j.	Encéphalite japonaise
M 632	<i>C. tritaeniorhynchus</i>	205	12 - 14/10/65	gorgés	+	16 j.	Encéphalite japonaise
M 642	<i>C. tritaeniorhynchus</i>	204	15 - 25/10/65	gorgés	0	12 j.	Encéphalite japonaise

2. Identification des souches

Les souches M 390 et M 406 ont été identifiées comme des virus dengue type 1 ou des agents étroitement apparentés à ce virus d'après les résultats de l'inhibition croisée de l'hémagglutination qui sont exposés dans le tableau 3.

Par la même technique, les souches M 593, M 613, M 632 et M 642 appartiennent au complexe St Louis du groupe B et peuvent être considérés comme des virus de l'Encéphalite japonaise « probables » (tableau 4). Ces résultats ont été confirmés par l'inhibition des plages en cultures cellulaires au moyen de 4 immuns-sérums : anti-TH 35, anti-TP 21, anti-WN et anti-JE (tableau 5). L'une de ces souches, M 593, a été adressée au Docteur M. KITAOKA,

du National Institute of Health à Tokyo, en vue de confirmer qu'il s'agit bien de virus de l'Encéphalite japonaise.

TABLEAU 3

Sérums	Virus (inhibition de l'hémagglutination) 8 unités						
	D1	D2	D3	D4	JE	M 390	M 406
Anti-D1	2.560	20	0	10	0	160	320
Anti-D2	20	1.280	20	20	20	10	20
Anti-D3	10	10	1.280	10	10	10	10
Anti-D4	10	10	10	80	20	10	10
Anti-JE	10	10	0	0	160	0	0
Anti-M 390	1.280	160	80	320	80	160	—
Anti-M 406	320	10	20	10	20	—	320

TABLEAU 4

Sérums	Virus (inhibition de l'hémagglutination) 8 unités										
	D1	D2	D3	D4	JE	WN	TP 21	M 593	M 613	M 632	M 642
Anti-D1	2560	160	40	20	20	20	20	40	10	10	10
Anti-D2	20	1280	20	20	20	10	10	20	10	0	10
Anti-D3	10	10	1280	10	10	20	10	20	10	0	—
Anti-D4	10	10	10	80	20	10	10	20	0	0	0
Anti-JE	0	10	10	10	1280	40	10	2560	640	160	320
Anti-WN	80	80	80	80	320	2560	80	640	80	40	80
Anti-TP 21	10	10	10	10	10	0	640	320	0	0	10
Anti-M 593	20	20	10	20	2560	80	20	5120	—	—	—
Anti-M 613	80	80	40	20	2560	320	40	—	2560	—	—
Anti-M 632	20	10	10	10	640	40	0	—	—	1280	—
Anti-M 642	40	40	20	20	640	160	20	—	—	—	1280

TABLEAU 5

Souche	Niveau de passage sur souches	Nombre de PFU introduits dans la réaction	Inhibition des plages par le sérum			
			Anti-TH35	Anti-TP21	Anti-WN	Anti-JE
M 593	3°	300	0	0	12 mm	21 mm
M 603	5°	800	0	0	0	0
M 613	7°	310	0	0	12,5 mm	25 mm
M 632	6°	100	0	0	13,5 mm	24 mm
M 642	4°	500	0	0	traces	23,5 mm
Virus homologue		200 - 2000	24,5 mm	24,5 mm	25 mm	25 mm

L'Hémagglutinine M 603 fut inhibée par un sérum de groupe A et non par un sérum de groupe B. Mais, contrairement à ce qui était supposé, il ne s'agit pas d'un virus Chikungunya, dont M 603 peut être distingué aisément ;

Un sérum de cobaye anti-Chikungunya, spécifique de type, reçu précédemment du Docteur J. CASALS, n'inhibe pas l'hémagglutinine M 603 et les plages M 603 ne sont pas inhibées par un sérum neutralisant anti-TH 35 (tableau 5). Nous avons adressé au Docteur J. CASALS, à New Haven, deux sérums de lapin préparés contre ce virus et un antigène FC obtenu par extraction saccharose-acétone, en vue de poursuivre l'identification de cet agent. Les résultats des réactions d'inhibition de l'hémagglutination qu'il a bien voulu effectuer avec les sérums anti-M 603 et 10 antigènes du groupe A, indiquent que M 603 est un virus Getah ou un virus apparenté (4). Nous le remercions très sincèrement de son aide.

COMMENTAIRES

L'isolement du virus dengue type 1 à partir d'un lot d'*Aedes aegypti*, même en l'absence de réisolement, ne pose pas de problème particulier. Il est en effet établi, à la suite de nombreux isollements, que cette espèce est le vecteur majeur de la dengue et des fièvres hémorragiques transmises par moustiques, dans tout le Sud-Est asiatique (16, 25, 24, 13, 3, 26, 14, 23). Ce même virus dengue type I est, à Phnom-Penh, le type antigénique de virus de la dengue qui a été le plus souvent isolé de l'homme depuis 1962.

L'isolement de ce virus n'a, par contre, jamais été signalé à partir de *Culex gelidus*. L'échec du réisolement, et le fait qu'il s'agissait de moustiques gorgés, limitent la portée de cette constatation. Cependant, comme d'autres arbovirus ont été isolés de cette espèce, en particulier le virus de l'Encéphalite japonaise (21), le virus Chikungunya (24), le virus Getah (AMM 2021) (30) et le virus Batai (AMM 2222) (30), il s'agit d'un moustique important du point de vue épidémiologique, dont l'étude doit être poursuivie.

Les 4 souches de virus de l'Encéphalite japonaise représentent les premiers isollements de ce virus au Cambodge, dont on pouvait d'ailleurs soupçonner la présence du fait d'arguments géographiques, entomologiques et sérologiques. Ces isollements répétés confirment le rôle essentiel de *Culex tritaeniorhynchus* dans sa transmission, que ce soit au Japon (15, 2, 19, 1), à Taiwan (28), à Okinawa (17), à Singapour (29) ou au Cambodge.

Le virus Getah a été isolé initialement en Malaisie de *C. gelidus* et de *C. tritaeniorhynchus* (30), puis en Australie d'*Anopheles amictus amictus* Edwards 1921 et de *Culex bitaeniorhynchus* Giles 1901. Ce virus est encore très mal connu et l'on ignore, en particulier, quel peut être son pouvoir pathogène pour l'homme et les animaux. Au point de vue antigénique, les virus Itakura et Sagiyama lui sont étroitement apparentés ; ils ont été isolés, le premier d'*Aedes vexans nipponii* Theobald 1907, au Japon (19), et le second de ce même moustique et de *C. tritaeniorhynchus*, au Japon (27) et à Okinawa (17).

La souche M 603 est le premier isolement du virus Getah au Cambodge. Que cette souche provienne également de *C. tritaeniorhynchus* souligne l'importance de ce dangereux moustique qui, en plus du virus de l'Encéphalite japonaise et du virus Getah, a été trouvé porteur d'un très grand nombre d'agents viraux : dengue type 3 (16), Akabane (19, 20), Chikungunya (24), Tembusu (AMM 1775) (30, 18), et Nodamura (MAG 15) (30).

Dans notre enquête, *C. tritaeniorhynchus* représente plus du tiers des moustiques inoculés et l'isolement de 5 souches d'arbovirus à partir de cette espèce est à opposer à l'absence totale d'isollements chez *Culex pipiens fatigans* (Wied-

mann) 1828. Ce dernier est pourtant le deuxième moustique, par l'importance numérique, dans nos captures.

Bien que ce travail n'ait pas été réalisé dans le but d'apprécier le nombre relatif des différentes espèces, un certain nombre d'observations ont été faites, à Chruï-Chang-War, qui peuvent avoir de l'importance au point de vue épidémiologique :

1° *Aedes aegypti* est présent en assez grand nombre pendant toute l'année et il existe, comme à Bangkok (12), un équilibre entre le nombre d'*A. aegypti* et de *C. pipiens fatigans* capturés. *A. aegypti* est plus abondant pendant la première partie de la saison des pluies, et *C. pipiens fatigans* pendant la seconde et en saison sèche.

2° *C. tritaeniorhynchus* est rencontré en très grand nombre, tout au long de l'année, mais surtout de juillet à octobre (deuxième partie de la saison des pluies).

3° Les isolements de virus de la dengue ont été réussis en mai, dès les premières pluies, tandis que ceux du virus de l'Encéphalite japonaise et du virus Getah l'ont été en septembre-octobre, peu avant la fin de la saison des pluies.

RESUME

Une enquête virologique a été effectuée pendant 15 mois sur des moustiques capturés dans 4 quartiers de la ville de Phnom-Penh (Cambodge). 103.267 femelles, appartenant à 6 genres et 28 espèces, ont été inoculées au souriceau en 650 lots. Ce travail a permis l'isolement de deux souches du virus dengue type 1 à partir d'*A. aegypti* L. et de *C. gelidus* Theo., de 4 souches du virus de l'Encéphalite japonaise à partir de *C. tritaeniorhynchus* Giles et d'une souche de virus Getah (AMM 2021), également de *C. tritaeniorhynchus*. Aucun isolement n'a été réussi à partir de *C. pipiens fatigans* Wiedemann (= *C. quinquefasciatus* Say).

SUMMARY

A virological survey on mosquitoes caught in four districts of the Phnom-Penh area (Cambodia) was performed during a period of 15 months. 103.267 female mosquitoes belonging to 6 genera and 28 species were pooled in 650 lots and inoculated to suckling mice. Two strains of dengue type 1 virus were isolated from *A. aegypti* L. and *C. gelidus* Theo., four strains of Japanese encephalitis virus from *C. tritaeniorhynchus* Giles and a strain of Getah virus (AMM 2021) also from *C. tritaeniorhynchus*. No isolation succeeded from *C. pipiens fatigans* Wiedemann (= *C. quinquefasciatus* Say).

Laboratoire des virus de l'Institut Pasteur
du Cambodge (Phnom-Penh),
Laboratoire d'Entomologie médicale
des Services Scientifiques Centraux
de l'O.R.S.T.O.M.
70, route d'Aulnay, 93 - Bondy - France.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 — BARNETT (H.C.) et GOULD (D.J.). — Vector reservoir relationships in the ecology of Japanese B Encephalitis. — *Ann. Microbiol.* (1963), 11, 79.
- 2 — BUESCHER (E.L.) SCHERER (W.F.), ROSENBERG (M.Z.), GRESSER (I.), HARDY (J.L.) et BULLOCK (H.R.). — Ecologic Studies of Japanese encephalitis virus in Japan. — III. Mosquito infection. — *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (1959), 8, 651.
- 3 — CAREY (D.E.), MYERS (R.M.) et REUBEN (R.). — Dengue type 1 and 4 viruses in wild-caught mosquitoes in South India. — *Science* (1964), 143, 131.
- 4 — CASALS (J.). — Communication écrite, 1966.

- 5 — CHASTEL (C.). — Infections humaines au Cambodge par le virus Chikungunya ou un agent étroitement apparenté : I. Clinique - Isolement et identification des virus - Sérologie. — *Bull. Soc. Path. exot.* (1963), 56, 892 — II. Anatomie pathologique expérimentale. — *Ibid.* (1963), 56, 915 — III. Epidémiologie. — *Ibid.* (1964), 57, 65.
- 6 — CHASTEL (C.). — Infections à arbovirus, in R. SOHIER. — Diagnostic des maladies à virus. — *Ed. Mém. Flammarion*, 1964, p. 813.
- 7 — CHASTEL (C.). — Technique des plages et de l'inhibition des plages en cultures cellulaires pour l'identification du virus de la Chorioméningite lymphocytaire. — *Ann. Inst. Pasteur* (1965), 109, 874.
- 8 — CHASTEL (C.). — Infections humaines au Cambodge par le virus TH 36 (« Dengue type 5 ») ou un agent étroitement apparenté. — *Bull. Soc. Path. exot.* (1965), 58 (sous presse).
- 9 — CHASTEL (C.). — Infections à arbovirus au Cambodge ; enquête sérologique chez les reptiles. — À paraître dans *Bull. O.M.S.*
- 10 — CLARKE (D.H.) et CASALS (J.). — Technique for Hemagglutination and Hemagglutination inhibition with arthropod-borne viruses. — *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1958, 7, 561.
- 11 — DOHERTY (R.L.), CARLEY (J.G.), MACKERRAS (M.J.) et MARKS (E.N.). — Studies of arthropod-borne virus infections in Queensland. - III. Isolation and characterisation of virus strains from wild-caught mosquitoes in North Queensland. — *Austral. J. Exp. Biol. Med. Sc.* (1963), 41, 17.
- 12 — HALSTEAD (S.B.), YAMARAT (C.) et SCANLON (J.E.). — The Thai Hemorrhagic fever epidemic of 1962 ; a preliminary report. — *J. Med. Assoc. of Thailand* (1963), 46, 449.
- 13 — HALSTEAD (S.B.), PAIRATANA SUKHAVACHANA et ANANDA NISALAK. — *In vitro* recovery of dengue viruses from naturally infected human beings and arthropods. — *Nature*, Londres (1964), 202, 931.
- 14 — HALSTEAD (S.B.), VOULGARPOULOS (E.), NGUYEN H. TIEN et SUCHINDA UDOMSAKDI. — Dengue hemorrhagic fever in South Vietnam ; Report of the 1963 outbreak. — *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (1965), 14, 819.
- 15 — HAMMON (W. Mc D.), TIGGERT (W.D.), SATHER (G.E.) et SCHENKER (H.). — Isolation of Japanese B encephalitis virus from naturally infected *Culex tritaeniorhynchus* collected in Japan. — *Am. J. Hyg.* (1949), 50, 51.
- 16 — HAMMON (W. Mc D.), RUDNICK (A.) et SATHER (G.E.). — Viruses associated with epidemic hemorrhagic fever of the Philippines and Thailand. — *Science* (1960), 131, 1102.
- 17 — HURLBUT (H.S.) et NIBLEY (C. Jr.). — Virus isolations from mosquitoes in Okinawa. — *J. Med. Entom.*, Honolulu (1964), 1, 78.
- 18 — MAC DONALD (W.W.), SMITH (C.G.E.) et WEBB (H.E.). — Arbovirus infections in Sarawak ; observations on the mosquitoes. — *J. Med. Entom.*, Honolulu (1965), 1, 335.
- 19 — MATSUYAMA (T.), OYA (A.), OGATA (T.), KOBAYASHI (I.), NAKAMURA (T.), TAKAHASHI (M.) et KITAOKA (M.). — Isolation of arboviruses from mosquitoes collected at live-stock pens in Gumma Prefecture in 1959. — *Jap. J. Med. Sc. & Biol.* (1960), 13, 191.
- 20 — OYA (A.), OKUNO (T.), OGATA (T.), KOBAYASHI (I.) et MATSUYAMA (T.). — Akabane, a new arbovirus isolated in Japan. — *Jap. J. Med. Sc. & Biol.* (1961), 14, 101.
- 21 — OLITSKY (P.K.) et CLARKE (D.H.). — Arthropod-borne Group B virus infections of man, in RIVERS and HORSEFALL, *Viral and Rickettsial infections of man.* — *Pitman Medical Publishing Co. Ltd.*, 3^e Edit. Londres 1959, p. 317.
- 22 — PORTERFIELD (J.S.) et ROWE (C.E.). — Hemagglutination with arthropod-borne viruses and its inhibition by certain phospholipids. — *Virology* (1960), 11, 765.
- 23 — PRICHA SINGHARAJ, PHINIT SIMASATHIEN, PAIRATANA SUKHAVACHANA, HALSTEAD (S.B.) et SCANLON (J.E.). — Recovery of dengue and other viruses in mice and tissue culture from Thai mosquitoes. — *WHO Seminar on Mosquito-borne haemorrhagic fevers in South East Asia and Western Pacific Regions - Bangkok, Thailand, 19-26 oct. 1964, WP/21.*
- 24 — ROBIN (Y.), YENBUTRA (D.) et DASANEYAVAYA (A.). — Une méthode d'isolement de virus à partir de moustiques vecteurs ; isolement de la première souche de l'Encéphalite japonaise B en Thaïlande. — *Méd. Tropicale*, Marseille (1963), 23, 781.

- 25 — RUDNICK (A.) et HAMMON (W. Mc D.). — Newly recognized *Aedes aegypti* problems in Manila and Bangkok. — *Mosq. News* (1960), 20, 247.
- 26 — RUDNICK (A.) et CHAN (Y.C.). — Dengue type 2 virus in naturally infected *Aedes albopictus* in Singapore. — *Science* (1965), 149, 638.
- 27 — SCHERER (W.F.), FUNKENBUSCH (E.L.), BUESCHER (E.L.) et IZUMI (T.). — Sagiya virus, a new group A arthropod-borne virus from Japan. - I. Isolation, Immunologic classification and ecologic observations. — *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (1962), 11, 255.
- 28 — WANG (S.P.), GRAYSTON (J.T.) et HU (S.M.K.). — Encephalitis on Taiwan. - III. Virus isolations from mosquitoes. — *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (1962), 11, 141.
- 29 — YIN-COgrave (M.) et PONG (V.S.). — A study of the mosquito vectors of viruses in Singapore. — *Ann. Trop. Méd. Parasit.* (1964), 58, 359.
- 30 — Catalogue of Arthropod-borne viruses, 1966.