



DÉVELOPPEMENT
DE SOUCHES SAUVAGES ET VACCINALES DU VIRUS
DE LA FIÈVRE JAUNE DANS LES CELLULES
DE *Aedes Aegypti* ET TRANSMISSION AU SOURICEAU

par V. Deubel ⁽¹⁾, J. L. Camicas ⁽²⁾, D. Pandare ⁽³⁾, V. Robert ⁽²⁾,
J. P. Digoutte ⁽¹⁾ et M. Germain ⁽²⁾

⁽¹⁾ Institut Pasteur, BP 220, Dakar,
⁽²⁾ ORSTOM, BP 1386, Dakar,
et ⁽³⁾ Faculté des Sciences, Dakar (Sénégal)

SUMMARY

DEVELOPMENT OF WILD AND VACCINAL YELLOW FEVER STRAINS
IN « *Aedes Aegypti* » CELLS AND TRANSMISSION TO SUCKLING MOUSE

The development and transmission of yellow fever virus in *Aedes aegypti* mosquito were studied after feeding or intrathoracic inoculation. Five different viral strains were examined: two vaccinal strains, one strain isolated from man in South America, two African wild strains isolated respectively from ticks and mosquitoes.

Depending on the examined wild strains, the results show great differences in the time of latency in the mosquito before it transmits the virus to the suckling mouse. It appears that the virus strains isolated in South America have a much longer time of latency than the African ones. Vaccinal strains do not develop in the mosquito fed on infected suckling mouse (table I, column 3). On the other hand, the mosquito is infected when intrathoracically inoculated. In that case transmission to suckling mouse is possible.

These experiments reveal the part of the intestinal barrier in the infection of *A. aegypti* mosquitoes, when fed with vaccinal strains.

A comparative study of these five viral strains was made *in vitro* in *A. aegypti*-cloned cells but with no greatly different specific results.

KEY-WORDS: Yellow fever virus, *Aedes aegypti*; Suckling mouse, Viral cycle, Vectors, Epidemiology.

Manuscrit reçu le 6 octobre 1980, accepté le 5 février 1981.

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

Fonds Documentaire

N° : 82/84/01373

Cote : B. ex 1

Date : 18 MAI 1982

INTRODUCTION

Il y a bien longtemps que les études du développement du virus amaril ont été pratiquées chez *Aedes aegypti* [12, 17, 18, 19] et chez *Haemagogus* [1, 2, 3, 4] avec analyse de différents facteurs influençant sa transmission [3]. Dernièrement, une étude comparative chez *A. aegypti* du développement et de la transmission entre un virus amaril et un virus Zika [6] a montré combien ce vecteur peut être important pour différencier certaines souches virales. De plus, il a été noté une différence dans le développement et la transmission de virus amarils adaptés au souriceau (souche fixe neurotrope [8] ou souche vaccinale française neurotrope du virus amaril (FNV) [4, 13]) ou à l'œuf embryonné (souche vaccinale Rockefeller 17D [20]).

Cependant, un certain nombre de points ne semblaient pas clairs en ce qui concerne l'absence de développement de tels virus atténués dans les cellules de *A. aegypti* alors qu'il a été montré récemment [10] qu'aucune différence fondamentale n'était enregistrée dans les cellules *in vitro*. Les auteurs qui avaient étudié les souches atténuées n'avaient pas à cette époque utilisé dans le cycle viral les souriceaux nouveau-nés ou l'infection des moustiques par voie intracœlomique (VIC).

Ce présent travail a pour but d'établir distinctement les différences pouvant exister dans le cycle viral entre des souches de virus amaril de provenances diverses, que ce soient des souches sauvages africaines et sud-américaines, isolées de moustiques, de tiques ou de l'homme, ou bien des souches de vaccin. L'étude *in vitro* précédemment menée pour deux souches virales sur le clone C17 de *A. aegypti* [10] a été continuée avec les souches utilisées ici *in vivo*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1) Souches virales.

Une souche a été isolée de *Aedes (Diceromyia)* du groupe *Furcifer taylori* en 1976 à Kédougou (Sénégal oriental) [5] — n° ARD 24553 — et testée à son quatrième passage sur cerveau de souriceau. Une souche a été isolée de la tique *Amblyomma variegatum*, en 1976 à Bangui (RCA) [11] — n° WBT 1927 — et testée à son quatrième passage sur cerveau de souriceau.

Une souche a été isolée du sang d'un malade en 1977 à Cayenne (Guyane) et testée également à son quatrième passage sur cerveau de souriceau.

Une souche de vaccin FNV est testée après 3 passages supplémentaires (263^e final) sur cerveau de souriceau et l'autre souche de vaccin Rockefeller 17D est testée après trois passages sur cerveau de souriceau.

Les cerveaux, broyés dans dix fois leur poids de milieu de Leibovitz contenant

FNV = souche française neurotrope du virus amaril (French neurotropic virus).

VD = voie digestive.

VIC = voie intracœlomique.

UFP = unité formatrice de plaque.

10 % de sérum de fœtus de veau, sont centrifugés à 5 000 rpm pendant 10 min et le surnageant est congelé à -70°C . Les titres oscillent entre 10^7 et $1,5 \times 10^8$ UFP/ml.

2) Cellules.

Les cellules précédemment clonées [9] sont du type fibroblastique (C17), isolées de cellules de *A. aegypti* Mos 20A [15]. Les cellules sont parvenues à leur onzième passage. Les conditions de culture sont les mêmes que précédemment [9]. Les cellules PS sont utilisées pour tous les titrages et recherches de virus par la méthode des plaques [9]. Les résultats sont exprimés en unités formatrices de plaques (UFP).

3) Moustiques.

Les moustiques utilisés sont des *A. aegypti* appartenant à une souche domestique originaire de Kébémér (Sénégal de l'Ouest) et colonisée depuis 1971 à l'insectarium de l'Institut Pasteur, dans lequel règnent une température constante de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ et une humidité de 95 à 100 %.

4) Souriceaux.

Toutes les études sont pratiquées sur souriceaux Swiss âgés de deux à quatre jours.

5) Étude in vitro.

Les cellules de *A. aegypti* C17, arrivées à confluence dans des plaques « Limbro » 24 cupules, sont infectées à raison de 12 cupules par virus avec la même concentration de virus, sous 0,4 ml, correspondant à une multiplicité d'infection de 5. Après 1 h 30 de contact, les cellules sont lavées trois fois avec de la solution de Hanks, puis 1 ml de milieu de culture est ajouté. Les plaques sont mises à incuber à 28°C et, à des temps déterminés, le surnageant d'une cupule pour chaque virus est recueilli et mis à congeler jusqu'au titrage.

6) Étude in vivo.

a) Infection des moustiques.

Deux voies d'infection sont utilisées :

— l'infection par voie digestive (VD) est pratiquée par immobilisation des souriceaux virémiques sur les cages de moustiques mis à jeûner depuis l'avant-veille ; la virémie de ces souriceaux, calculée après inoculation du virus par voie cérébrale, est de l'ordre de 2×10^4 UFP/ml sang ; après 6 h, les souriceaux sont retirés et leur virémie est contrôlée ;

— l'inoculation intracœlomique (VIC) est pratiquée selon la technique récemment décrite [7, 14] ; le volume injecté au moustique est de l'ordre de $0,3 \mu\text{l}$ et les suspensions virales utilisées ont un titre de l'ordre de 10^7 UFP/ml.

b) Études de la transmission.

Deux types de transmission au souriceau sont pratiqués :

— le premier, collectif, consiste à faire gorger des moustiques sur des souriceaux immobilisés sur la cage (environ 5 souriceaux pour 100 moustiques) ; s'il n'y a qu'une cage, les souriceaux y sont placés quotidiennement, et s'il y a deux cages les souriceaux y sont placés alternativement, un jour sur l'une, un jour sur l'autre ; enfin les souriceaux sont récupérés à la 6^e heure puis observés pendant 20 jours, et les manifestations cliniques sont notées quotidiennement ;

— dans le deuxième type de transmission, les moustiques à jeun sont placés

individuellement dans des flacons en verre recouverts de toile de nylon ; sur chaque flacon, un souriceau est maintenu pendant 6 h puis observé pendant 20 jours ; après le gorgement, chaque moustique est broyé individuellement dans un petit broyeur à tissu à 0° C et le broyat est dilué dans 1 ml de milieu de Leibovitz contenant 10 % de sérum de fœtus de veau, centrifugé à 3 000 t/min à 4° C, puis congelé à - 70° C jusqu'au titrage.

RÉSULTATS

Essai de transmission au souriceau de différents virus du moustique infecté par VD.

Le temps de latence entre le gorgement du moustique sur souriceau virémique et la possibilité de transmission du virus ont été étudiés. Les deux types de transmission, individuelle ou collective, ont été employés. Le tableau I indique pour chaque virus le nombre de moustiques utilisés pour l'étude, le nombre de transmissions testées, le temps de latence avant la première transmission positive, et la date moyenne à laquelle les souriceaux sont morts de fièvre jaune. Pour un certain nombre de souriceaux morts, la fixation du complément ou la séroneutralisation ont été contrôlées pour chaque type de virus.

TABLEAU I. — Essai de transmission de différents virus amarils au souriceau à partir de moustiques infectés par voie digestive (température du laboratoire : 25° C).

(a)	Nb de moustiques testés	Nb de transmissions testées à partir du 7e jour	Nb de moustiques positifs	Nb de transmissions positives sur nombre de souriceaux	Période de la transmission (en jours) après l'infection des moustiques	Délai (en jours) des souriceaux mourant de fièvre jaune
ARD 24553	180	17	83 (3,89) (*)	33/180	13-22	7-11
FNV	202	14	0	0/202	—	—
(b)						
WBT 1927	200	10	NT	43/67	9-20	6-11
Cayenne	200	10	NT	10/102	17-20	7-10
17D	400	23	0/170 (**)	0/462	—	—

(a) Chaque moustique est mis individuellement en contact avec un souriceau, puis broyé et titré ; (*) 3,89 représente le titre moyen de virus par moustique en log UFP.

(b) Il s'agit de transmission collective où les mêmes moustiques sont testés plusieurs fois et conservés jusqu'à la fin du test ; (**) les moustiques restants sont broyés et titrés individuellement. NT = non testé.

Les deux souches de vaccin ne se sont pas développées dans l'organisme du moustique, même après un délai de 30 jours ; et, de ce fait, aucune transmission n'a pu être observée. Pour la souche sud-américaine, le délai est plus long que pour les souches africaines. Le virus qui est retransmis en forte quantité le plus tôt est le virus isolé de la tique. Pour les trois virus sauvages, l'âge des souriceaux morts de fièvre jaune est sensiblement le même.

Multiplication d'un virus amaril sauvage (ARD 24553) et des virus amarils vaccinaux inoculés par VIC à A. aegypti et transmission après 15 jours au souriceau nouveau-né.

L'inoculation par VIC chez *A. aegypti* de ces trois virus, ARD 24553, FNV et 17D, a été pratiquée avec une même quantité de virus. Les moustiques sont testés au 15^e jour après leur infection ; ce temps nous a semblé suffisant car une étude préliminaire avec le virus sauvage a montré que la transmission se faisait au 6^e jour après l'infection par VIC, donc beaucoup plus tôt que lorsque l'infection a eu lieu par VD. La transmission a été pratiquée par gorgement individuel des moustiques sur souriceau, et chaque vecteur a été broyé individuellement et titré.

Le tableau II indique la quantité de moustiques positifs et le pourcentage de transmission du virus à partir des moustiques positifs, ainsi que la date d'apparition de la mort des souriceaux pour chacun des virus. Les virus vaccinaux se développent chez le moustique lorsqu'ils sont introduits par la voie parentérale, car tous les moustiques se sont avérés positifs dans ce cas. Le pourcentage de transmission pour le FNV et le virus sauvage est voisin et semblable au pourcentage de transmission observé lorsque le moustique a été infecté par VD avec la souche ARD 24553 (33/83,

TABLEAU II. — Développement chez « *A. aegypti* » à 25° C et transmission individuelle d'un virus amaril sauvage et de deux virus amarils vaccinaux 15 jours après leur infection par VIC.

	Nb de moustiques testés	Moustiques présentant du virus	Titre de virus du moustique en log UFP/moustique	Transmission au souriceau positive	% de transmission nb de souriceaux morts/nb de souriceaux testés	Délai de mort des souriceaux
ARD 24553	29	23 (*)	4,1	12	52	7-12
FNV	31	31	3,8	14	45	7-10
17D	300	—	—	35 (**)	22	7-20
	54	54	3,7	3	6	12-16

(*) Le fait que tous les moustiques ne soient pas infectés reste inexplicé car, en général, comme ici avec FNV et 17D, 100 % des moustiques inoculés par VIC avec une concentration suffisante de virus sont infectés.

(**) Cette valeur indique le nombre de souriceaux morts après 8 essais de transmission collective lorsque l'on place quotidiennement, à partir du 7^e jour des souriceaux sur la cage. Le 15^e jour, 54 des mêmes moustiques sont utilisés pour la transmission individuelle.

tableau I). Par contre pour le virus 17D, la transmission est plus faible et les souriceaux meurent plus tardivement. Le fait peut être expliqué par l'atténuation du virus 17D qui est très peu pathogène lorsqu'il est introduit par voie autre que la voie intracérébrale. En effet, pour une suspension virale, le rapport du titre de DL_{50} par voie intracérébrale sur le titre de DL_{50} par voie sous-cutanée est de l'ordre de 500 pour le virus 17D alors qu'il n'est que de 10 pour les autres virus (DL_{50} = dose virale tuant 50 % des souriceaux).

Infection in vitro des cellules de A. aegypti par les différents types de virus amarils.

La figure 1 représente les courbes de croissance des virus amarils sur le clone C17 de *A. aegypti* à 28° C. Les cellules sont infectées avec une multiplicité d'infection de 5, identique pour les cinq virus.

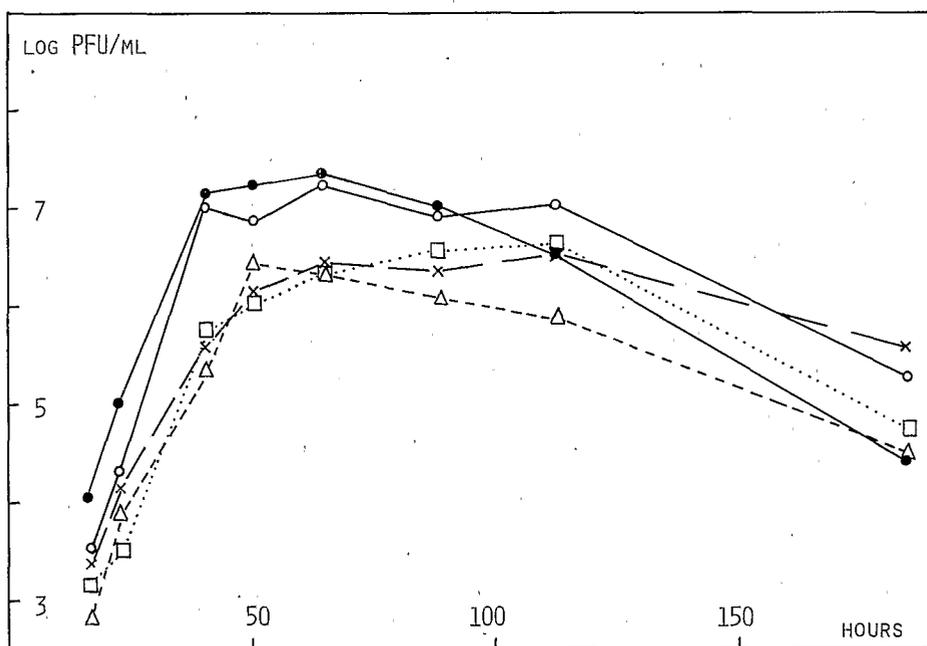


FIG. 1. — Courbes de production virale sur le clone C17 de *A. aegypti* à 28° C (MI : 5).
○ = WBT 1927, ● = ARD 24553, × = Cayenne, □ = FNV, Δ = 17D (Δ).

Il existe un retard dans la production de virus pour les souches de vaccin et la souche de Cayenne, par rapport aux souches isolées à partir d'arthropodes. Le titre maximal de virus dans le surnageant est également plus faible pour ces trois virus. L'effet cytopathogène est plus précoce et plus prononcé pour les souches sauvages, y compris celle de Cayenne, que pour les souches FNV et 17D.

Les titrages des virus produits par les cellules C17 ont été pratiqués sur des cellules PS. La forme des plages est représentée sur la figure 2. Les virus FNV et 17D ainsi que le virus de Cayenne forment de grandes plages, alors que les virus isolés d'arthropodes forment de petites plages. Les plus petites plages correspondent aux virus isolés de moustiques.

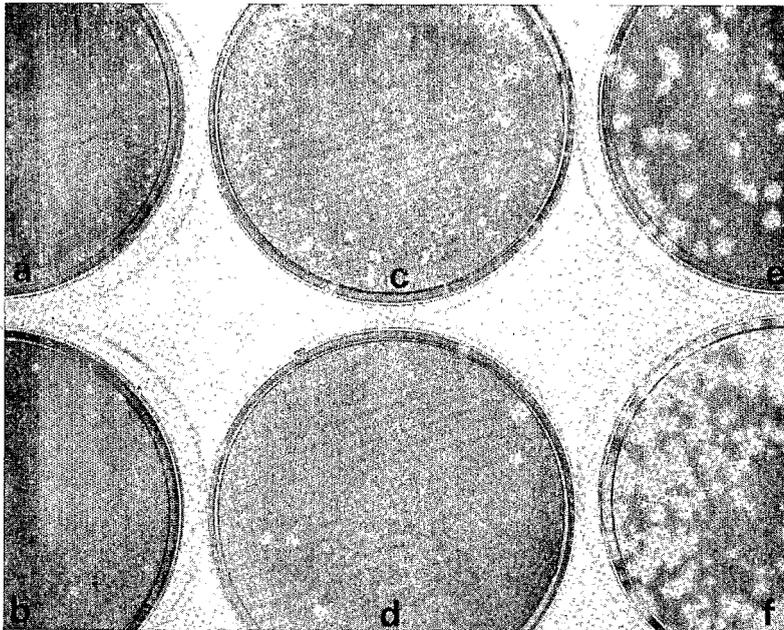


FIG. 2. — Production de plages dans les cellules PS à partir de surnageant de culture de cellules de *Aedes C17* infectées par différentes souches de virus amaril.

a-d = souches sauvages : a = ARD 24553 *A. furcifer taylori* ; b = B 5654 *A. africanus* ; c = WBT 1927 *Amblyomma variegatum* ; d = souche humaine isolée à Cayenne ; e-f = souches vaccinales : e = 17D ; f = FNV.

Coloration au naphthalène « blue black » 6 jours après l'infection des cellules.

DISCUSSION

Le développement et la transmission de différents virus amarils sont analysés chez le moustique *A. aegypti* ; ce vecteur est infecté par VD ou par VIC.

Avec les souches sauvages, tous les moustiques ne se sont pas infectés par VD, sans doute parce que la quantité de virus absorbée n'est pas suffisante. Nous l'avons calculée comme étant de l'ordre de 60 UFP. La part incriminée à des moustiques qui ne sont pas gorgés est faible et n'a pas été retenue. Le titre du virus dans l'organisme du moustique infecté est de l'ordre de 10^4 UFP et voisin de ceux trouvés précédemment [18].

Lorsque le vecteur est infecté par VD avec les virus africains, certains moustiques se positivent dès le cinquième jour après s'être gorgés et ils ne

sont en mesure de pouvoir retransmettre le virus au souriceau qu'au neuvième (WBT 1927) ou au treizième jour (ARD 24553) ; cela peut être dû à une invasion tardive des glandes salivaires. Ces résultats sont à rapprocher de ceux précédemment obtenus [6]. Mais avec un virus sud-américain, le délai avant la transmission est beaucoup plus long et atteint 17 jours. Chez *A. aegypti* un délai de 16 jours [19] et chez *Haemagogus* un délai de 22 jours [2] ou même de 28 jours [3] avaient été enregistrés dans les mêmes conditions de température avec un virus sud-américain.

Les travaux précédents avaient signalé la difficulté ou l'impossibilité que l'on rencontrait à transmettre à des mammifères du virus atténué à partir de moustiques infectés par voie digestive [4, 8, 13, 20]. Des tentatives de transmission de virus FNV à des singes à partir de *A. aegypti* [13] ou de *Haemagogus* [4] n'ont pas abouti. Avec beaucoup de difficultés il a été possible d'infecter *A. aegypti* et de retransmettre le virus fixe neurotrophe, mais dans ce cas le virus n'avait que 149 à 181 passages sur souris et n'était pas identique au virus FNV [8]. Dans notre étude, aucun moustique ne s'est infecté par voie digestive avec le FNV ou le 17D, bien que la virémie sur le souriceau soit identique à celle obtenue avec les virus sauvages. Cela suggère que ces virus ne passent pas la barrière intestinale. Il est peu probable que le moustique s'infecte au-delà de trente jours après le repas infectant.

L'hypothèse d'un barrage dû à la barrière intestinale nous a incités à la court-circuiter et à infecter le moustique directement par la VIC. Des moustiques avaient été précédemment infectés avec le virus 17D en plongeant les larves dans du cerveau de souriceau infecté [20]. Les adultes s'étaient avérés porteurs de virus mais incapables de le transmettre au singe. Tous les moustiques sont infectés par VIC avec les souches FNV et 17D, ce qui montre bien que ce type de virus peut se développer chez le moustique comme les virus sauvages et que, dans ce cas, il est transmis au souriceau.

Le moustique *A. aegypti* est un excellent modèle pour l'étude des virus amarils, et il est intéressant de comparer les différents virus sur culture de cellules du même type d'arthropode. Les différences observées ne sont pas aussi nettes qu'*in vivo* et la souche sud-américaine a un comportement très voisin de celui des souches vaccinales par sa courbe de croissance et la forme des plages. Seul le test *in vivo* permet de différencier cette souche des autres. A la différence de certains auteurs [16], un effet cytopathogène des cellules infectées est observé quel que soit le type de souches utilisées. La souche 17D a un comportement identique à celui de la souche FNV précédemment étudiée [10].

Des résultats obtenus dans l'étude du développement et de la transmission de virus amarils chez *A. aegypti* sont d'un grand intérêt pour la compréhension du cycle biologique et du rôle que peut jouer le vecteur dans la mise en circulation et le maintien du virus dans la nature. Le rôle du moustique dans la sélection de différentes formes de virus amaril est à expérimenter plus profondément. Les études biochimiques devraient pouvoir différencier ces diverses souches virales et permettre d'expliquer les relations différentes qui existent avec l'hôte-vecteur. La méthode de gor-

gement de moustiques sur souriceau virémique, infecté par du virus amaril, représente un moyen simple de différenciation entre une souche de fièvre jaune sauvage et vaccinale.

RÉSUMÉ

Le développement et la transmission du virus amaril dans l'organisme du moustique *Aedes aegypti* ont été étudiés après infection par voie digestive (VD) et par voie intracœlomique (VIC). Cinq virus de provenance différente sont étudiés, dont deux souches utilisées comme vaccin. Les résultats montrent de grandes différences selon les souches dans le temps de latence chez le moustique avant la transmission du virus au souriceau. Il semble que les souches de virus isolées en Amérique du Sud aient un temps de latence beaucoup plus long que celui des souches africaines. Les souches atténuées ne se multiplient chez le moustique que si elles sont inoculées par VIC et elles peuvent alors être transmises au souriceau.

Une étude comparative des 5 souches virales est pratiquée *in vitro* dans un clone de cellules de *A. aegypti* en culture, mais il semble difficile d'établir un critère différentiel spécifique.

MOTS-CLÉS : Virus de la fièvre jaune, *Aedes aegypti* ; Souriceau, Cycle viral, Vecteurs, Épidémiologie.

REMERCIEMENTS

Le Docteur Y. Robin, Directeur de l'Institut Pasteur de Cayenne, nous a permis par ses connaissances de réaliser efficacement ce travail et nous le remercions très sincèrement. Nous remercions également G. Hème et M. M. Diop pour leur très appréciable assistance technique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ANDERSON, C. R. & OSORNO-MESA, E., The laboratory transmission of yellow fever virus by *Haemagogus splendens*. *Amer. J. trop. Med.*, 1946, 26, 613-618.
- [2] BATES, M. & ROCA-GARCIA, M., Laboratory studies of the saimiri-*Haemagogus* cycles of jungle yellow fever. *Amer. J. trop. Med.*, 1944, 25, 203-216.
- [3] BATES, M. & ROCA-GARCIA, M., The development of the virus of yellow fever in *Haemagogus* mosquitoes. *Amer. J. trop. Med.*, 1946, 26, 585-605.
- [4] BATES, M. & ROCA-GARCIA, M., An experiment with neurotropic yellow fever virus in saimiri monkeys and *Haemagogus* mosquitoes. *Amer. J. trop. Med.*, 1946, 26, 607-612.
- [5] CORNET, M., ROBIN, Y., HÈME, G. & VALADE, M., Isolement au Sénégal oriental d'une souche de virus amaril à partir d'un lot d'*Aedes* du sous-genre *Diceromyia*. *C. R. Acad. Sci. (Paris) (Sér. D)*, 1978, 287, 1449-1451.

- [6] CORNET, M., ROBIN, Y., ADAM, C., VALADE, M. & CALVO, M. A., Transmission expérimentale comparée du virus amaril et du virus Zika chez *Aedes aegypti* L. *Cah. O. R. S. T. O. M., Sér. Ent. méd. Parasit.*, 1979, 17, 47-53.
- [7] COZ, J., VALADE, M., CORNET, M., LEMOINE, M. O. & CORAND, A., Utilisation du moustique pour la multiplication des arbovirus. *Cah. O. R. S. T. O. M., Sér. Ent. méd. Parasit.*, 1977, 15, 200-212.
- [8] DAVIS, N. C. LLOYD, W. & FROBISHER, M., The transmission of neurotropic yellow fever virus by *Stegomyia* mosquitoes. *J. exp. Med.*, 1932, 56, 853-865.
- [9] DEUBEL, V. & DIGOUTTE, J. P., Morphogenesis of yellow fever virus in *Aedes aegypti* cultured cells. — I. Isolation of different cellular clones and the study of their susceptibility to infection with the virus. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 1981 (à paraître).
- [10] DEUBEL, V., DIGOUTTE, J. P., MATTEI, X. & PANDARE, D., Morphogenesis of yellow fever virus in *Aedes aegypti* cultured cells. — II. An ultrastructural study. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 1981 (à paraître).
- [11] GERMAIN, M., SALUZZO, J. F., CORNET, M., HERVÉ, J. P., SUREAU, P., CAMICAS, J. L., ROBIN, Y., SALAUN, J. J. & HÈME, G., Isolement du virus de la fièvre jaune à partir de la ponte et de larves d'une tique *Amblyomma variegatum*. *C. R. Acad. Sci. (Paris) (Sér. D)*, 1979, 289, 635-637.
- [12] LEWIS, D. J., HUGUES, T. P. & MAHAFFY, A. F., Experimental transmission of yellow fever by three common species of mosquitoes from the Anglo-Egyptian Sudan. *Amer. J. trop. Med. Parasit.*, 1942, 36, 34-38.
- [13] PELTIER, M., DURIEUX, C., JONCHÈRE, H. & ARQUIÉ, E., La transmission par piqûre de *Stegomyia* du virus amaril neurotrope présent dans le sang des personnes récemment vaccinées est-elle possible dans les régions où ce moustique existe en abondance ? *Rev. Immunol.*, 1939, 2, 172-195.
- [14] ROSEN, L. & GUBLER, D., The use of mosquitoes to detect and propagate dengue viruses. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 1974, 23, 1153-1160.
- [15] VARMA, M. G. R. & PUDNEY, M., The growth of serial passage of cell line from *Aedes aegypti* (L.) larvae in different media. *J. med. Entomol.*, 1969, 6, 432-439.
- [16] VARMA, M. G. R., PUDNEY, M., LEAKE, C. J. & PERALTA, P. H., Isolation in a mosquito (*Aedes pseudoscutellaris*) cell line (Mos 61) of yellow fever virus strains from original field material. *Intervirology*, 1975/1976, 6, 50-56.
- [17] WADDEL, M. B. & TAYLOR, R. M., Studies on cyclic passage of yellow fever virus in South American mammals and mosquitoes. *Amer. J. trop. Med.*, 1945, 25, 225-230.
- [18] WHITMAN, L., The multiplication of the virus of yellow fever in *Aedes aegypti*. *J. exp. Med.*, 1937, 66, 133-143.
- [19] WHITMAN, J. & ANTUNES, P. C. A., The transmission of two strains of jungle yellow fever virus by *Aedes aegypti*. *Amer. J. trop. Med.*, 1938, 18, 135-147.
- [20] WHITMAN, L., Failure of *Aedes aegypti* to transmit yellow fever (17D). *Amer. J. trop. Med.*, 1939, 19, 19-26.