

**Actualidad**

## ¿El Virus del Serogrupo Bunyamwera norteamericano es el Agente Etiológico de Fallas del Sistema Nervioso Central Congénitas Humanas ?

En 1941 Gregg brindó la primer evidencia que el virus de la Rubéola (familia *Togaviridae*, género *Rubivirus*) ocasiona fallas congénitas humanas (1). Aunque la infección por el virus de la rubéola comúnmente ocasiona una enfermedad leve que comprende fiebre y salpullido, las epidemias de rubéola han sido asociadas con fallas congénitas en niños de mujeres quien fueron infectadas durante el primer trimestre del embarazo (2). El riesgo de infección de rubéola en el útero fue reducido por la introducción de vacunas efectivas y seguras para mujeres en edad de criar niños. Las anomalías congénitas en fetos o rumiantes neonatales también se relacionan con la exposición de hembras preñadas a virus diversos, incluyendo el virus de la diarrea viral bovina (familia *Togaviridae*, género *Pestivirus*), el virus mantenido por artrópodos del bluetongue «lengua azul» (familia *Reoviridae*, género *Orbivirus*), el virus de *Wesselsbron* (familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus*), el virus de la fiebre del Valle de Rift (familia *Bunyaviridae*, género *Phlebovirus*). Las infecciones de ganado con estos virus pueden producir bajos-títulos de viremia con ninguna enfermedad clínica evidente, o altos-títulos de viremia y enfermedad clínica severa en la hembra. En las infecciones del útero puede resultar en malformaciones del feto en desarrollo, muerte fetal con reabsorción, momificación, o aborto. Los rumiantes recién nacidos pueden mostrar diversos defectos musculoesqueléticos y del sistema nervioso central, incluyendo un síndrome de artrogriposis con hidrocefalia (AGH).

Los virus del serogrupo Bunyamwera (familia *Bunyaviridae*, género *Bunyavirus*) han sido aislados de humanos, y algunos, incluyendo los virus de Cache Valley (CV) y Tensaw (TEN), han sido aislados de grandes mamíferos sintomáticos y asintomáticos (11). Los anticuerpos anti virus de CV y a otros virus del serogrupo Bunyamwera son frecuentes en el ganado y mamíferos grandes silvestres y en humanos en el Hemisferio Occidental desde Alaska a Argentina (11). Los virus de este serogrupo son aislados primariamente de mosquitos de los géneros *Aedes* y *Anopheles*. Estos virus tienen distribuciones geográficas focales, aunque algunos se encuentran en grandes extensiones. El virus de CV, un bunyavirus común norteamericano, ha sido aislado principalmente de mosquitos de los géneros *Culiseta*, *Aedes*, y *Anopheles*. La distribución geográfica

de este virus incluye todo América del Norte, exceptuando los estados del extremo sudeste y sur de México (11). El virus TEN, también fue aislado de mosquitos de los géneros *Anopheles* y *Aedes* en el sudeste de los Estados Unidos, es el único representante conocido del serogrupo Bunyamwera, probablemente a causa del rango del vector principal y de los hospedadores vertebrados; la exclusión mutua de estos dos virus probablemente ocurre a causa de la protección cruzada entre ellos (12).

Asociaciones de infección serológica y temporal con el virus de CV y malformaciones congénitas, incluyendo primariamente AGH, fueron observados en ovejas cerca de San Angelo, Tejas, entre Diciembre de 1986 y Febrero de 1987, sugiriendo que este virus ocasiona AGH (13). Brotes subsiguientes de defectos congénitos similares ocurrieron en ovejas en Illinois en 1988 (J. Pearson, com. pers.) y en Dakota del Norte, Pensilvania, Maryland, Michigan, y Nebraska en 1986 y 1987 (14). Anticuerpos al virus de CV (pero no a otros virus) fueron encontrados para correlacionar significativamente con la ocurrencia de AGH y otras anomalías congénitas durante el brote de Tejas (15, 16), y anticuerpo IgM al virus de CV fue detectado en neonatos libres de calostro con AGH (C.H. Calisher, datos inéditos). (Ni la IgM ni la IgG maternal cruza la placenta en ovejas; por lo tanto, los anticuerpos en fetos o en neonatos antes que ellos recibieran calostro indica exposición fetal al agente infeccioso (17).) En 1976, anticuerpos al virus de CV fueron detectados en el suero del ganado que habían liberado terneras con AGH en Saskatchewan, Canadá, en 1975; sin embargo, la prevalencia de anticuerpos al virus de CV en la población vacuna de esa área no fue investigado (R.E. Shope, com. pers.)

En Tejas, en 1981, el virus de CV fue aislado de unas ovejas enfermas y de una vaca sana en una manada con problemas reproductivos (18). Este virus también fue aislado en Tejas en 1988 de unas ovejas sentinel en pastura donde un brote de defectos congénitos había ocurrido en 1986 a 1987. Estos datos históricos sugieren que los virus CV relacionados con malformaciones congénitas pueden estar más difundidas que lo que ha sido reconocido. Las infecciones experimentales han brindado evidencia adicional que el virus de CV ocasiona muerte embrionaria y múltiples malformaciones congénitas de ovejas (19)

y ganado (J. Edwards, com. pers.). No ha sido informada ninguna asociación del virus TEN y enfermedad en el ganado, animales silvestres, o humana. Para determinar si la infección con virus del serogrupo Bunyamwera selecto, CV y TEN, están asociados con ciertas fallas congénitas humanas, una seroevaluación fue realizada con muestreos de suero de madres de niños con microcefalia o macrocefalia, y los resultados fueron comparados con aquellos de edad y ubicación equiparados con controles. Los resultados, informados aquí, brindaron la primer evidencia que estos virus del serogrupo Bunyamwera pueden ser agentes etiológicos de ciertas fallas congénitas del sistema nervioso central humano.

Dos grupos de 500 muestras de suero humanos cada uno se seleccionaron al azar de una colección almacenada en el National Institutes of Health (NIH), Bethesda, Maryland y analizados para anticuerpos neutralizantes.

Estos muestreos fueron parte de una colección de especímenes de sueros obtenidos entre 1959 y 1964, al parto o post partum, (de cerca de 50.000 mujeres matriculadas bajo protocolos definidos en un estudio prospectivo de síndrome de rubéola congénita). Las muestras habían sido recolectadas de todas las mujeres embarazadas cuidadas en una institución particular o de mujeres accidentalmente seleccionadas para usar el último dígito de su número de inscripción de hospital. Para una primera serie de pruebas, los muestreos fueron seleccionados desde 200 madres de niños con macrocefalia (tamaño de cabeza por lo menos dos desviaciones standard arriba de la media) y de 50 madres de niños con microcefalia (tamaño de cabeza por lo menos dos desviaciones standard por debajo de la media). El espécimen inicial de madres con los respectivos defectos fueron seleccionadas para la prueba. Un número igual de madres de bebés sin defectos obvios del sistema nervioso central fueron seleccionadas como controles, que fueron equiparados en edad ( $\pm 2$  años) y equiparados en el sitio, fueron registrados para el estudio en el mismo mes, y fueron de la misma raza como madres de niños con macrocefalia o microcefalia. Las muestras de Suero que comprendieron este primer grupo habían sido recolectadas de mujeres embarazadas en Boston, Massachusetts (104), Providence, Rhode Island (20), New York, New York (72), Philadelphia, Pennsylvania (36), Baltimore, Maryland (38), Buffalo, New York (50), Minneapolis, Minnesota (42), Charlottesville, Virginia (38), Memphis, Tennessee (52), New Orleans, Louisiana (36), y Portland, Oregon (12); estos fueron analizados para anticuerpos neutralizantes a ocho bunyavirus (Tabla 1).

Unas 500 muestras adicional fueron probadas; 250 muestras pareadas, seleccionados como arriba, desde la misma colección del archivo, de cada dos mujeres de Boston (120), Buffalo

(40), New Orleans (8), Ciudad de New York (46), Baltimore (8), Charlottesville (12), y Minneapolis (16), incluyendo controles (seleccionados como arriba). Estos fueron sólo analizados buscando anticuerpos neutralizantes contra el virus de CV, para seguir los resultados de las pruebas con el primer conjunto de muestras.

Una muestra de cada una de estas mujeres había sido recolectada en el primer trimestre del embarazo y la segunda había sido recolectada luego de por lo menos de tres meses. Las muestras de suero fueron almacenadas congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta que fueron enviados en hielo seco ( $-70^{\circ}\text{C}$ ) a los Centers for Disease Control laboratory at Fort Collins, Colorado.

Veintinueve de las primeras 500 muestras de suero analizadas contenían anticuerpos neutralizantes contra CV, 29 tenían anticuerpo contra TEN, 29 contra Jamestown Canyon, 26 contra La Crosse, nueve contra Lokern, y seis contra el virus de Buttonwillow. Ninguno tenía anticuerpos contra los virus de Main Drain o Mermet. No se observaron diferencias importantes en las prevalencias de anticuerpo contra los virus de La Crosse, Jamestown Canyon, Lokern, y Buttonwillow entre madres de infantes microcefálicos y macrocefálicos y controles equiparados en edad y ubicación (Tabla 1). Los casos no fueron revisados para otros defectos.

La prevalencia de anticuerpos contra el virus de CV en madres de infantes microcefálicos no fue significativamente diferente de la prevalencia de tales anticuerpo en su control equiparado, pero la presencia de anticuerpos contra el virus de CV en madres se correlacionó significativamente con macrocefalia en sus infantes ( $\chi^2$ , d.f.=1,  $n=400$ ,  $4.797$   $p < 0.05$ ) (Tabla 1).

Ninguna de las muestras con anticuerpos neutralizantes al virus CV o TEN (títulos en el rango desde 10 a 80) tuvieron anticuerpos IgM. Para determinar si había diferencias estadísticamente significativas entre prevalencias de anticuerpo anti virus CV o TEN en madres con infantes macrocefálicos y en controles equiparados en edad y sitio, fue usado el chi-cuadrado de McNemar's. No se encontró diferencia significativa para la presencia de anticuerpo al virus CV ( $p > 0.05$ ), pero la presencia de anticuerpo al virus TEN ( $p < 0.05$ ) o de anticuerpos para tanto el virus CV o TEN ( $p < 0.02$ ) fue relacionada a la ocurrencia de macrocefalia en los infantes de estas madres (Tabla 2).

La tabla 3 resume la presencia de anticuerpos al virus CV y al TEN en mujeres por ubicación del hospital y resultado del nacimiento. Cuando la prevalencia de anticuerpos al virus CV o TEN en estas mujeres fue analizado por el resultado de nacimiento y ubicación, ninguna diferencias estadísticamente significativa fue determinada (no se muestran los datos comparativos).

Cuando el segundo conjunto de 500 muestras (250 muestras pareadas en embarazo temprano y tardío) fue analizado, las muestras de ocho mujeres tuvieron anticuerpos neutralizantes al virus de CV. Ningún cambio significativo diagnósticamente del título fue detectado entre seis pares de muestras, pero aumentos en cuatro veces del título fue detectado en otros dos, (10 a 80, < 10 a 40), indicando infecciones recientes con el virus de CV o con un virus estrechamente relacionados al grupo Bunyamwera. Seis de las ocho mujeres en este grupo con anticuerpo al virus de CV parieron infantes macrocefálicos, incluyendo dos (una en New Orleans y uno en la Ciudad de New York) cuyos especímenes mostraron aumentos en el título al virus de CV.

Estos análisis brindaron la primer evidencia que los virus del serogrupo Bunyamwera en América del Norte estaban asociados con defectos congénitos en humanos: la ocurrencia de macrocefalia en infantes fue correlacionado positivamente con los anticuerpos al virus de CV. Anticuerpos contra el virus TEN y al virus CV o al TEN correlacionaron con microcefalia y con macrocefalia.

La presencia de anticuerpo al virus CV y al TEN correspondió con las distribuciones geográficas conocidas de estos virus dentro de los Estados Unidos. El anticuerpo a cualquiera de estos virus en una mujer que vive en un área donde ese virus no es conocido que ocurra puede reflejar la estrecha relación antigénica y considerable reactividad cruzada de estos virus del serogrupo Bunyamwera (22), diferencias entre cepas locales y prototipos de virus, o el viaje a un área en que el virus ocurre (23). Las dos mujeres con aumentos diagnósticamente importantes en el título de anticuerpos al virus de CV (una de New Orleans, donde el virus TEN ha sido aislado, y una de New York, donde el virus de CV ha sido aislado) son, tanto como sabemos, las primeras dos personas con aumentos de anticuerpos documentados al virus del serogrupo Bunyamwera en América del Norte. Si cada uno de ellas tuvieron una enfermedad asociada no pudo determinarse a partir de los registros. Que entre todas las mujeres analizadas fueron las únicas con alzas en el título de anticuerpo y que ambas dieron nacimiento a infantes macrocefálicos es, al menos, una coincidencia fascinante. Los anticuerpos IgM en infecciones humanas ocasionadas por otro bunyavirus no puede persistir por mucho más que unos pocos meses después de la infección (21); en humanos no han sido detectados anticuerpos IgM contra virus del serogrupo Bunyamwera en América del Norte. Por lo tanto, la ausencia de anticuerpos IgM de especímenes con anticuerpo neutralizante probablemente indica que estas infecciones no

eran agudas, p. ej., ocurrieron meses antes de la recolección de muestras.

Un problema fundamental en establecer una relación entre la infección de mamíferos con virus CV o TEN y las anomalías congénitas acompañadas es la insuficiencia inherente de controles. La presencia de anticuerpos en humanos u otros animales con progeñie normal no argumenta necesariamente contra la hipótesis que el virus de CV ocasiona defectos congénitos en humanos debido a que la infección podría haber ocurrido antes de la preñez. Además, aun cuando este virus puede ser un agente etiológico de anomalías congénitas, los anticuerpos preexistentes a este virus podría brindar inmunidad para la madre y protege al feto de la infección viral. Así, no puede determinarse a punto fijo si la presencia de anticuerpo al virus es fortuita, o una causa de las anomalías congénitas observadas.

La revisión de registros de NIH para este conjunto relativamente pequeño de muestreos sugirieron que la macrocefalia ocurría algo más frecuentemente cuando en el primer trimestre de preñez incluyó los meses de Abril y Mayo para mujeres que viven en New Orleans (4/16), Memphis (5/16), y Charlottesville (3/12) y a fines del verano-otoño temprano para mujeres que viven en Boston (6/49), Minneapolis (3/11), Portland (2/6), y New York City (9/33). En cada caso, estos períodos coinciden gruesamente con la aparición de poblaciones de mosquitos *Culiseta*, *Aedes*, o *Anopheles*, los vectores de los virus CV y TEN. Sin embargo, el virus de CV no puede implicarse en infecciones en New Orleans porque este virus no se conoce que ocurra allí, aunque el virus TEN lo hace.

Los tamaños de muestreo relativamente pequeño en este estudio permiten la interpretación estadística pero no brindan apoyo suficiente para garantizar declaraciones con respecto a la importancia biológica de los hallazgos; por lo tanto, nosotros consideramos a estos datos meramente preliminares. La determinación de si estos datos tienen mérito, espera de los resultados de estudios adicionales de madres de niños con defectos congénitos y su progeñie.

Estudios más extensivos son también necesarios para investigar la influencia de la fase gestacional y el desarrollo fetal en los defectos congénitos; establecer relaciones entre el pico de abundancia de artrópodos vectores y el primer trimestre de embarazo; la sucesión de genomas de cepas virales de CV y TEN de áreas geográficas diversas y establecer relaciones entre diferente virulencia y secuencias génicas en el ganado; y desarrollar capacidad diagnóstica para usar anticuerpos monoclonales, ensayos de hibridización, reacción en cadena de la polimerasa, y técnicas de Western blotting.

Dado que muchos miembros de la familia Bunyaviridae ocasionan defectos congénitos en el ganado naturalmente y experimentalmente infectado, o pueden tener tal potencialidad (24,25), sería útil continuar las investigaciones con animales domésticos y en desarrollar modelos de laboratorio para evaluar la teratogenicidad potencialidad para humanos de los virus CV, TEN, y de otros virus de la familia Bunyaviridae.

Es también importante determinar los papeles de los virus CV y TEN en inducir defectos congénitos humanos y las relaciones entre la prevalencia de anticuerpo a los virus CV y TEN, preponderancia de fallas congénitas, y fechas de concepción, todos con respecto a condiciones ambientales locales.

**Charles Calisher, Ph.D., \* y John Sever, M.D. ^ \***

Colorado State University, Fort Collins, Colorado, USA; ^George Washington University Medical Center, Children's National Medical Center, Washington, D.C., USA

#### Agradecimientos:

Los autores agradecen al Dr. Maneth Gravell y Ms. Dorothy O'Neill, Institutes of Health, Bethesda, Maryland, por seleccionar, clasificar, y enviar las muestras séricas; Sr. Raymond E. Bailey, Centers for Disease Control and Prevention, Fort Collins, Colorado, por el consejo estadístico; Dr. Thomas P.C. Monath, Division of Vector-Borne Infectious Diseases, CDC, Fort Collins, para su aliento y apoyo; y Drs. Barry Beaty, Colorado State University, Fort Collins, and John Edwards, Texas A & M University, College Station, Texas, por sus sugerencias editoriales.

#### Referencias

1. Gregg N McA. Congenital cataract following German measles in the mother. *Trans Ophthal Soc Austral* 1941;3:35-46.
2. Best JM, O'Shea S. Rubella virus. In: Schmidt NJ, Emmons RW, editors. *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections*, 6th ed. Washington, DC: American Public Health Association 1989:751-95.
3. Oberst RD. Viruses as teratogens. *Vet Clin North Am; Food Anim Prac* 1993;9:23-31.
4. Erasmus BJ. The history of bluetongue. In: Barber TL, Jochim MM, editors. *Bluetongue and related orbiviruses*. New York: AR Liss, 1985:7-12.
5. Calisher CH, Monath TP. *Togaviridae* and *Flaviviridae*: the alphaviruses and flaviviruses. In: Lennette EH, Halonen P, Murphy FA, editors. *Laboratory diagnosis of infectious diseases*, vol. 2. New York: Springer-Verlag, 1988:414-34.
6. Calisher CH, Shope RE. *Bunyaviridae*: the bunyaviruses. In: Lennette EH, Halonen P, Murphy FA, editors. *Laboratory diagnosis of infectious diseases*, vol. 2. New York: Springer-Verlag, 1988:626-46.
7. Kurogi H, Inaba Y, Takahashi E, Sato K, Omori T, Miura Y, et al. Epizootic congenital arthrogryposis-hydranencephaly syndrome in cattle: isolation of Akabane virus from affected fetuses. *Arch Virol* 1976;51:67-74.
8. Kurogi H, Inaba Y, Takahashi E, Sato K, Satoda K, Goto Y, et al. Congenital abnormalities in newborn calves after inoculation of pregnant cows with Akabane virus. *Infect Immun* 1977;17:338-43.
9. Parsonson IM, Della-Porta AJ, Snowdon WA, Murray MD. Congenital abnormalities in foetal lambs after inoculation of pregnant ewes with Akabane virus. *Austral Vet J* 1975;51:585-6.

Tabla 1. Anticuerpo al virus del Cache Valley, Tensaw, La Crosse, Jamestown Canyon, Lokern, o Buttonwillow en madres de infantes microcefálicos o macrocefálicos equiparados a controles.

Anticuerpos al virus	condición del infante	X <sup>2</sup> c( )
Cache Valley	Microcefalia	3.840(0.05)
	Macrocefalia	4.797(<0.05)
	Either	0.915(>0.20)
Tensaw	Microcefalia	4.891(<0.05)
	Macrocefalia	4.071(<0.05)
	Either	0.329(>0.20)
Cache Valley o Tensaw	Microcefalia	5.983(<0.02)
	Macrocefalia	4.806(<0.05)
La Crosse	Microcefalia	0.211(>0.20)
	Macrocefalia	1.481(>0.20)
Jamestown Canyon	Microcefalia	0.709(>0.20)
	Macrocefalia	0.037(>0.20)
Lokern	Microcefalia	1.010(>0.20)
	Macrocefalia	2.041(>0.10)
Buttonwillow	Microcefalia	2.041(>0.10)
	Macrocefalia	<0.001(>0.20)

Los Bunyavirus usados para todos las pruebas fueron todos prototipos: (Bunyamwera serogrupo) CV (strain 6V-633), TEN (A9-171b), Lokern (FMS-4332), Main Drain (BFS-5015), (California serogrupo) La Crosse (Original), Jamestown Canyon (61V-2235), (Simbu serogrupo) Buttonwillow (A-7956), and Mermat (AV-782). Las muestras fueron estudiadas para anticuerpos por reducción de neutralización en dilución en placa (20). Resumidamente, sueros diluidos y calentados o inactivados C/30 min) fueron agregados a partes iguales con un volumen viral conteniendo aproximadamente 200 unidades formadoras de placa (PFU), lo cual da una concentración final de 100 PFU. Suero humano fresco a la concentración del 8% fue agregado a todas las suspensiones virales. Las mezclas de virus-suero fueron incubadas a 4°C por 18 h, y 0,1 alícuotas de 1 ml fueron agregadas en el centro de un cultivo de células Vero creciendo en placas plásticas de 6 pocillos. Después de un período de adsorción de 45 min. las células fueron cubiertas con un medio conteniendo 2% de agar y fueron incubadas luego por 70 a 75 h a 37 °C en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>-95%. Una capa de medio conteniendo 2% agar, y reajo neutro 1:25,000 fue agregado, y las placas fueron nuevamente incubadas hasta la lectura, usualmente entre 12 a 36 h después.

Una muestra de suero fue considerada positiva cuando fue reducida el número de placas a 90% con respecto a la control, el cual tenían un rango de 80 a 150 placas. Las muestras que fueron positivas en el screening (1:10) fueron tituladas a punto final, y el título del suero se tomó como la mayor dilución de suero que redujo el número de placas en un 90%.

Aunque los controles positivos para detectar IgM humana por ELISA de captura no se pudo realizar, las muestras de suero fueron analizadas por una modificación de la técnica publicada para detectar anticuerpos IgM al serogrupo viral California (21). Muestras de suero de ratón o cabra conteniendo IgM anti virus CV o muestras de suero de ratón con anticuerpos conteniendo anticuerpos IgM anti el virus TEN sirvieron como controles positivos y negativos. El análisis estadístico fue realizado mediante chi-cuadrado o chi-cuadrado de McNemar.

Tabla 2. Presencia de anticuerpo al virus del Cache Valley y Tensaw en madres de infantes macrocefálicos y en controles equiparados.

Mothers of macrocephalic infants	No.	Antibody-positive controls	Antibody-negative controls
Antibody to CV virus	16	3	13
No antibody to CV virus	184	5	179
McNemar's test(a)			
Antibody to TEN virus	15	1	14
No antibody to TEN virus	185	5	180
McNemar's test(b)			
Antibody to CV or TEN virus (or both)	19	3	16
No antibody to CV or TEN virus	181	5	176
McNemar's test(c)			

(a)  $(13-5)/18 = 3.556$  (d.f. = 1),  $p > 0.05$ .

(b)  $(14-5)/19 = 4.263$  (d.f. = 1),  $p < 0.05$ .

(c)  $(16-5)/21 = 5.762$  (d.f. = 1),  $p < 0.02$ .

Tabla 3. Anticuerpo al virus de Cache Valley y Tensaw en mujeres, por el resultado de nacimiento y ubicación.

Lugar	Anticuerpos al virus CV		Anticuerpos al Virus TEN	
	En mujeres con niños macrocefálicos nº (%)	En Controles nº (%)	EN mujeres con niños macrocefálicos nº (%)	En Controles nº (%)
Boston	2/49(4.1)	1/49(2.0)	1/49(2.0)	1/49(2.0)
Providence	0/7	1/7(14.3)	0/7	1/7(14.3)
New York City	2/33(6.1)	1/33(3.0)	1/33(3.0)	1/33(3.0)
Philadelphia	0/15	2/15(13.3)	1/15(6.7)	2/15(13.3)
Minneapolis	1/11(9.1)	0/1	1/11(9.1)	0/11
Charlottesville	2/12(16.7)	0/12	2/12(16.7)	0/12
Memphis	6/16(37.5)	3/16(18.8)	5/16(31.3)	1/16(6.3)
New Orleans	1/16 (6.3)	0/1	2/16(12.5)	0/16
Portland	2/6 (33.3)	0/6	2/6(33.3)	0/6

10. Coverdale OR, Cybinski DH, St. George TD. Congenital abnormalities in calves associated with Akabane and Aino virus. *Austral Vet J* 1978;54:151-2.

11. Calisher CH, Francy DB, Smith GC, Muth DJ, Lazuick JS, Karabatsos N, et al. Distribution of Bunyamwera serogroup viruses in North America, 1956-1984. *Am J Trop Med Hyg* 1986;35:429-43.

12. Calisher CH. Evolutionary significance of the taxonomic data regarding bunyaviruses of the family Bunyaviridae. *Intervirol* 1988;29:268-76.

13. Crandell RA, Livingston CW. Laboratory investigation of a naturally occurring outbreak of arthrogryposis-hydranencephaly in Texas sheep. *J Vet Diagn Invest* 1988;1:62-5.

14. Rook JS, Yamini B, Steficek B. AGH syndrome: cooperation answers questions. *National Wool Grower* 1988(April):24-5.

15. Edwards JF, Livingston CW, Chung SI, Collisson EC. Ovine arthrogryposis and central nervous system malformations associated with in utero Cache Valley virus infection: spontaneous disease. *Vet Pathol* 1989;26:33-9.

16. Edwards JF. Cache Valley virus. *Vet Clin North Am; Food Anim Prac* 1994;10:515-24.

17. Campbell SG, Siegel MJ, Knowlton BJ. Sheep immunoglobulins and transmission to the neonatal lamb. *NZ Vet J* 1977;25:361-5.

18. McConnell S, Livingston C Jr, Calisher CH, Crandell R. Isolations of Cache Valley virus in Texas, 1981. *Vet Microbiol* 1987;13:11-8.

19. Chung SI, Livingston CW Jr, Edwards JF, Gauer BB, Collisson

EW. Congenital malformations in sheep resulting from in utero inoculation of Cache Valley virus. *Am J Vet Res* 1990;51:1645-8.

20. Lindsey HS, Calisher CH, Mathews JH. Serum dilution neutralization test for California group virus identification and serology. *J Clin Microbiol* 1976;4:503-10.

21. Calisher CH, Pretzman CI, Muth DJ, Parsons MA, Peterson ED. Serodiagnosis of La Crosse virus infections in humans by detection of immunoglobulin M class antibodies. *J Clin Microbiol* 1986;23:667-71.

22. Calisher CH, Lazuick JS, Lieb S, Monath TP, Castro KG. Human infections with Tensaw virus in south Florida: evidence that Tensaw virus subtypes stimulate the production of antibodies reactive with closely related Bunyamwera serogroup viruses. *Am J Trop Med Hyg* 1988;39:117-22.

23. Calisher CH, Sabattini MS, Wolff KL, Monath TP. Cross-neutralization tests of South American isolates of Cache Valley virus revealing the existence of multiple subtypes. *J Trop Med Hyg* 1988;39:202-5.

24. Parsonson IM, Della-Porta AJ, Snowdon WA. Developmental disorders of the fetus in some arthropod-borne virus infections. *Am J Trop Med Hyg* 1981;30:660-73.

25. McPhee DA, Parsonson IM, Della-Porta AJ, Jarrett RG. Teratogenicity of Australian Simbu serogroup and some other Bunyaviridae viruses: the embryonated chicken egg as a model. *Infect Immun* 1984;43:413-20.