

ESTUDIO SOBRE LA ENFERMEDAD DE TYZZER (*Clostridium piliforme*) EN DIFERENTES CEPAS DE RATAS Y RATONES DE LABORATORIO INFECTADAS EXPERIMENTALMENTE

Ayala MA¹, Milocco SN¹, Galosi CM^{2,3} Carbone C¹

¹Cátedra de Animales de Laboratorio y Bioterio. ²Cátedra de Virología.

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

³Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires.

RESUMEN: Los animales de laboratorio, como reactivos biológicos vivos, deben ser estandarizados genética y microbiológicamente, para que los resultados de las experiencias sean confiables, reproducibles y comparables. El uso de animales en estado de salud deficiente conduce irreversiblemente a la obtención de resultados erróneos. *Clostridium piliforme* es el agente productor de la enfermedad de Tyzzer y hasta el momento se desconocía la susceptibilidad o resistencia a este agente en las diferentes cepas de ratas y ratones. En este trabajo se evaluó, utilizando inoculaciones experimentales, la resistencia y/o susceptibilidad al *Clostridium piliforme* en las diferentes cepas de ratas y ratones de Argentina; se estableció la concentración de microorganismos requerida para producir la morbilidad, pero no la mortalidad; se confirmaron las propiedades biológicas del *Clostridium piliforme* y se determinó el grado de protección brindado por los anticuerpos producidos en animales inoculados con diferentes concentraciones del microorganismo. Se observó que *Clostridium piliforme* es igualmente patógeno para ambas especies y cepas con algunas diferencias en las lesiones encontradas. Se determinó que la dosis de 2×10^5 y 2×10^6 microorganismos no enfermó a los animales, estimuló a la producción de los anticuerpos y protegió contra una descarga de dosis letal, por lo que se puede considerar que estas dosis pueden ser utilizadas para proteger a los animales de una colonia.

Palabras claves: *Clostridium piliforme*, Infección experimental, Ratas, Ratones

STUDY ON TYZZER'S DISEASE (*Clostridium piliforme*) IN DIFFERENT LABORATORY RATS AND MICE STRAINS EXPERIMENTALLY INFECTED

ABSTRACT: Laboratory animals like alive biological reactive, must be genetically and microbiologically defined in order to obtain reliable results. The use of unhealthy animals in research leads to wrong results. Tyzzer's disease is caused by *Clostridium piliforme* and the susceptibility or resistance in different rats and mice strains was unknown. In this study, the resistance and susceptibility to *Clostridium piliforme* in different rats and mice strains of Argentina were evaluated by experimental infection. The microbial concentration which produces the disease but not death was established. The biological properties of *Clostridium piliforme* were confirmed and the antibodies protection given in animals inoculated with different concentrations of *Clostridium piliforme* was determined. It was noted that *Clostridium piliforme* is equally pathogenic for different rats and mice strains with some differences in the lesions found. It was determined that the dose of 2×10^5 and 2×10^6 microorganisms, which stimulated the production of antibodies against Tyzzer's disease, did not cause illness in inoculated animals but they were protected against lethal dose. For that reason dose of 2×10^5 and 2×10^6 microorganisms could be used to protect rats and mice in a colony.

Key words: *Clostridium piliforme*, Mice, Rats, Experimental Infection

Fecha de recepción: 13/01/10

Fecha de aprobación: 20/01/10

Dirección para correspondencia: Miguel Ayala, Cátedra de Tecnología y Sanidad de los Alimentos. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata. Argentina. Tel/fax: 0221-421-1276. **E-mail:** mayala@fcv.unlp.edu.ar

INTRODUCCION

Clostridium piliforme es el agente productor de la enfermedad de Tyzzer. Es un germen Gram negativo, con forma de bastón, de 8 a 10 µm de largo por 0,5 µm de ancho, con tendencia al pleomorfismo. Forma esporas terminales, es móvil por sus flagelos peritricos y se tiñe rápidamente con tinturas básicas de anilinas (PAS – positivo). La técnica de impregnación argéntica es la más adecuada para su demostración con cortes histológicos (1, 2). *Clostridium piliforme* no desarrolla en medios de cultivos libres de células, por lo que es un parásito intracelular obligado. Se reproduce bien en huevos embrionados de gallina inoculados en el saco vitelino o en cultivo primarios de hepatocitos de embriones de pollo o de ratón. La forma vegetativa del bacilo fuera de la célula hospedadora no es viable por lo que es muy inestable y pierde rápidamente la virulencia, excepto si se lo mantiene a -70 °C. Se disemina a través de los esporos que contaminan el lecho de los animales infectados y el medioambiente sobreviviendo en éste por varios años. Son muy resistentes a la repetición de ciclos de congelamiento y descongelamiento, resisten 1 h hasta 60 °C y son inactivados a 80 °C durante 30 min. Los esporos son resistentes al etanol, a los detergentes fenólicos germicidas y a los compuestos de amonio cuaternario, pero son inactivados por el formol, iodofosforados, ácido peracético e hipoclorito de sodio. Los esporos se pueden observar con la tinción de safranina (2, 3).

Se conoce que la enfermedad de Tyzzer afecta a una gran variedad de animales que incluyen a los ratones, ratas, hámsteres, meriones, conejos, cobayos, gatos, perros, ratas almizcleras, coyotes, zorros, liebres, monos y equinos. No se han informado casos en humanos, aunque se ha registrado un caso espontáneo en un primate no humano (*mono rhesus*) (3, 4, 5).

Su presencia se ha registrado en la mayoría de los países del mundo, con una distribución heterogénea. La forma vegetativa es inestable fuera de una célula hospedadora viable, el modo más probable de diseminación es por la ingestión de los esporos esparcidos con las heces. Las epizootias con alta mortalidad aparecen en meriones, hámsteres, ratas y conejos. La forma subclínica es la más frecuente de presentación. La forma clínica de la enfermedad se observa cuando los animales son sometidos a estrés por ejemplo por mal manejo, transporte o destete, o se lo somete natural o experimentalmente a una inmunosupresión (por ejemplo la administración con cortisona o exposición a radiación) (6, 7). Los signos clínicos que presentan pueden ser diarrea, deshidratación, anorexia, lordosis, pelo hirsuto, distensión abdominal y muerte (8, 9).

La patogénesis de la enfermedad de Tyzzer es incierta. Se desconocen los mecanismos

por los cuales *Clostridium piliforme* se adhiere e ingresa en la célula huésped. La primera fase de la infección es la colonización del intestino (íleon y ciego), luego el microorganismo (MO) asciende hasta el hígado a través de la vena porta y finalmente se disemina por otros tejidos como el miocardio. Microscópicamente, en el hígado y corazón, se pueden observar pequeños focos necróticos grises, blancos o amarillentos de 2 mm de diámetro. El intestino presenta inflamación con producción de gas, distensión y hemorragia en la serosa. Microscópicamente las lesiones de la enfermedad de Tyzzer se caracterizan por necrosis de las células hospedadoras y por la visualización de la típica disposición aleatoria de los bacilos con forma de bastón en el citoplasma celular, aparentemente viables en los bordes de las zonas necróticas. Se puede observar una infiltración moderada de neutrófilos y macrófagos como así también grados variables de cecocolitis, hepatitis y miocarditis. Las lesiones entéricas (con presencia de bacilos en células epiteliales y en células del músculo liso del tejido muscular de la mucosa) tienden a ser severas en ciertas especies como el conejo, hámster y merión. Las lesiones que se observan con mayor frecuencia en todas las especies animales afectadas es la necrosis hepática focal. En las lesiones que se recuperan el bacilo está ausente y se observa infiltrado celular neutrófilo y mononuclear en las áreas afectadas. Los esporos son eliminados con la materia fecal. Los cambios de lecho frecuentes y una buena desinfección de las cajas y jaulas ayudan a evitar la diseminación de los esporos en el medio ambiente (7, 8, 9, 10, 11).

El diagnóstico se basa en la demostración del agente bacilar en el citoplasma de las células del borde de las áreas necróticas. La identificación del agente en los tejidos se puede confirmar mediante la técnica de anticuerpos fluorescentes y tinción de Giemsa. El diagnóstico serológico de las infecciones inaparentes se realiza mediante la detección de anticuerpos utilizando los métodos de enzimo inmuno ensayo (ELISA) o inmunofluorescencia indirecta (IFI). El MO puede aislarse inoculando por vía endovenosa (EV) una suspensión fresca de hígado de animales infectados a ratones recién destetados e inmunodeprimidos previamente o inoculando huevos embrionados en cavidad alantoidea (11, 12, 13, 14).

Las epizootias con alta mortalidad se suceden generalmente en ciertas especies de animales ante situaciones de estrés e inmunosupresión y como consecuencia de ello las experiencias para las que están siendo utilizados estos animales finalizan prematuramente. A modo de ejemplo, puede citarse la alteración de las actividades enzimáticas hepáticas que producen resultados no confiables en estudios toxicológicos del hígado. No existen vacunas disponibles contra este

MO. Las vacunas inactivadas con formalina, que producen inmunidad contra la infección, sólo tuvieron éxito en ratones vacunados experimentalmente (12).

En este trabajo se evaluó la resistencia o susceptibilidad a la enfermedad de Tyzzer en las diferentes cepas de ratas y ratones, se estableció la concentración de MO requerida para producir la morbilidad pero no la mortalidad en ratas y ratones y se determinó el grado de protección brindado por los anticuerpos producidos en animales inoculados con diferentes concentraciones de *Clostridium piliforme*.

MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron 352 ratones y 242 ratas procedentes de diferentes instituciones privadas y estatales (Tablas 1 y 2).

Tabla N° 1: Cepas de ratones utilizados en este estudio (n = 22 por cada cepa)

BALB/c AnN,	CDA	C57BL/6 AnN	DBA/2
BALB/c J	CF-1	C57BL/6 J	HAIR-LESS
BALB/c Nake,	C3H/N	C57BL/6 nu/nu	MPS
BALB/c nu/nu	C3H/Hen	DBA/1	N: NIH (S)-nu

Tabla N° 2: Cepas de ratas utilizadas en este estudio (n = 22 por cada cepa)

ACI/N	LEW/N	WISTAR
BUS	LONG EVANS	WKHA/Hok
BN	SHR	WKY
F344/N	SPRAG DOWLEY	

Los animales se mantuvieron bajo barreras sanitarias, a 22° C +/-1 °C de temperatura y con humedad del 50 %, con aire filtrado (Filtros Hepa 99,9 %) a razón de 15 recambios por hora, en cajas de acero inoxidable (n=4 por caja), con lecho de viruta estéril. Se les proporcionó agua de bebida suplementada con vitaminas y alimento (Cooperación S.R.L.), autoclavados y *ad-libitum*. Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo a las normativas internacionales fijadas por la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Consejo de Investigación Nacional de Estados Unidos, y el Consejo Canadiense para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (<http://bioethics.od.nih.gov/animals.html>).

CEPA DE CLOSTRIDIUM PILIFORME – INOCULACION EXPERIMENTAL

Se trabajó con la cepa de referencia RT cedida por el Instituto Nacional de Salud de Japón (NIH-Japón, Dra. E Suzuki). Se prepararon

homogenatos de hígados e intestinos con áreas necróticas, provenientes de animales infectados con la cepa de referencia. Se inocularon 0,1 ml de los mismos, por vía EV a 8 animales de las diferentes cepas de ratas y ratones; 2 animales por cada grupo fueron utilizados como controles negativos.

SEGUIMIENTO CLÍNICO DE LOS ANIMALES INOCULADOS, EUTANASIA Y NECROPSIA

Los animales fueron observados diariamente a las 8 y 18 horas a partir del 1° día pos infección (pi) para constatar la aparición de signos clínicos característicos. A los 4 días pi se sacrificaron los animales con y sin signología clínica y los animales controles negativos, con una mezcla de 70 % CO₂ y 30 % O₂. Se necropsiaron todos los animales sacrificados y se realizaron improntas del borde de las lesiones encontradas para su posterior tinción con Giemsa y Verde de malaquita y para la técnica de IFI.

TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

Las improntas se fijaron con acetona fría y se enfrentaron con un suero control positivo anti *Clostridium piliforme* (NIH-Japón, Dra. E Suzuki) durante 30 minutos a 37 °C. Posteriormente se lavaron 3 veces durante 5 minutos cada vez con solución buffer fosfato (PBS), se cubrieron con el conjugado anti-ratón marcado con fluoresceína (Zymed Laboratories, INC. CA, USA) incubándose a 37 °C durante una hora, se lavaron con PBS y se observaron al microscopio de fluorescencia para confirmar la presencia o ausencia del MO.

INFECCIÓN EXPERIMENTAL SUBLETAL Y DESAFÍO

Se prepararon homogenatos con concentraciones de 2x10⁵, 2x10⁶ y 2x10⁷ MO para una dosis de 0,1 ml, a partir de los hígados que presentaron lesiones necróticas de los animales infectados con la cepa RT del *Clostridium piliforme*. Estas dosis fueron inoculadas a ratones y ratas de las diferentes cepas, de 6 semanas de edad, divididos en 3 grupos de 3 individuos cada uno y dejando otro grupo de 3 animales como control sin inocular. Los animales que sobrevivieron a la infección subletal fueron desafiados con una dosis letal de 2 x10⁷ MO por vía EV a la 12° semana pi.

TITULACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA CLOSTRIDIUM PILIFORME

Se tomaron muestras de sangre de la vena maxilar externa una vez por semana hasta la 12° semana pi a todos los animales que sobrevivieron a la inoculación experimental subletal. La sangre se colocó a 4 °C durante 12 horas y luego se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min. El suero

obtenido fue diluido 1:5 en PBS y posteriormente inactivado a 56 °C durante 20 min para su posterior almacenamiento a -20 °C hasta su uso.

Se realizó la técnica de IFI utilizando los sueros problemas en diluciones en base 2 (a partir de la dilución 1:5 y hasta 1:640).

RESULTADOS

Los signos clínicos se observaron entre el 2° y 3° día pi en el 78,75 % de todas las cepas de ratones y entre el 7° y 9° día pi en el 78,18 % de todas las cepas de ratas. Clínicamente los animales presentaron lordosis, decaimiento, distensión abdominal, pelo hirsuto y diarrea.

Los hallazgos de la necropsia pueden resumirse de la siguiente manera:

HALLAZGOS EN RATONES

De los 8 animales inoculados de la cepa BALB/cAnN, 7 presentaron lesiones en miocardio, hígado e intestino (Figura 1).

El total de los ratones de la cepa BALB/cJ (n=8) presentaron las mismas lesiones que la cepa anterior.

En la cepa coisogénica BALB/cNackt se observó que 7 animales presentaban lesiones en miocardio, pero no en hígado e intestino.

Todos los animales de la cepa BALB/c-*nu* mostraron lesiones en el hígado, corazón e intestino.

En los ratones CDA se comprobó que sólo 5 presentaron necrosis hepática típica e inflamación intestinal.

Seis animales del stock CF1 presentaron lesiones en hígado e intestino.

Las cepas C3H/N (n=6) y C3H/HeN (n=7) mostraron las lesiones típicas de la enfermedad: necrosis hepática periportal multifocal, inflamación intestinal y diarrea.

Siete animales de la cepa C57BL/6AnN y 6 de la cepa C57BL/6J presentaron lesiones en hígado e intestino.

Las cepas C57BL/6-*nu* (n=8), DBA/1 (n=4), DBA/2 (n=6), HAIRLESS (n=4) y MPS (n=5) mostraron las lesiones de hígado e intestino típicas de la enfermedad (Figura 2).

En el stock N:NIH(S)-*nu* los 8 individuos presentaron lesiones sólo en hígado e intestino.

HALLAZGOS EN RATAS

Todas las cepas de ratas: ACI/N (n=7), BUS (n=6), BN (n=7), F344/N (n=6), LEW/N (n=5), LONG EVANS (n=6), SHR (n=4), WKHA/Hok (n=7), WKY (n=5) presentaron lesiones típicas de la enfermedad (Figura 3).

Los stock WISTAR (n=7) y SPRAG DOWLEY (n=8) también fueron positivas a las lesiones típicas.

Ninguno de los animales utilizados como controles presentaron signos clínicos, ni lesiones

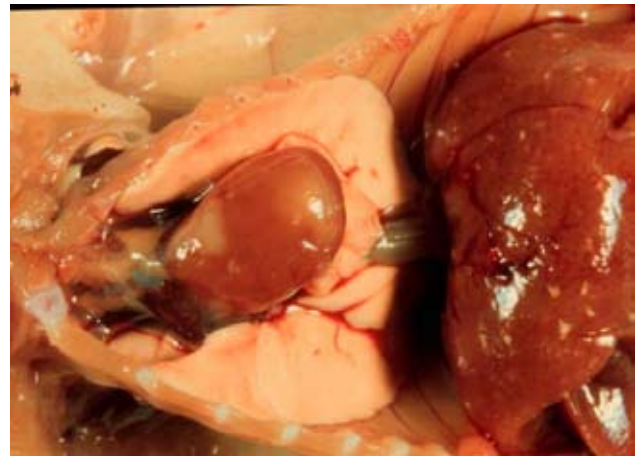


Figura 1. Observación macroscópica. Las flechas indican la presencia de focos de necrosis en hígado y miocardio de ratón infectado por *Clostridium piliforme*.

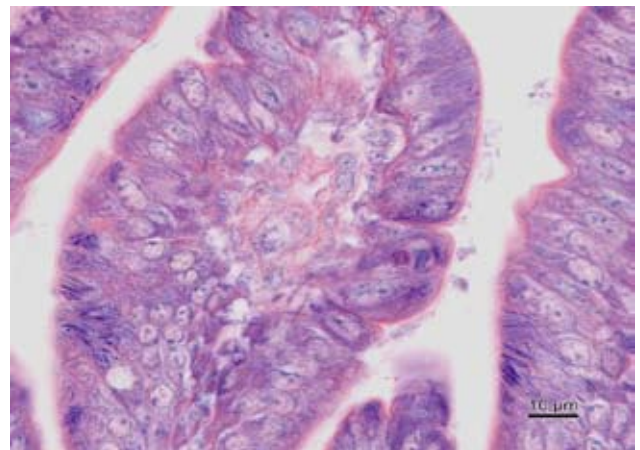


Figura 2. Observación microscópica. Las flechas indican la presencia de *Clostridium piliforme* en la vellosidad del intestino de ratón infectado. 100X

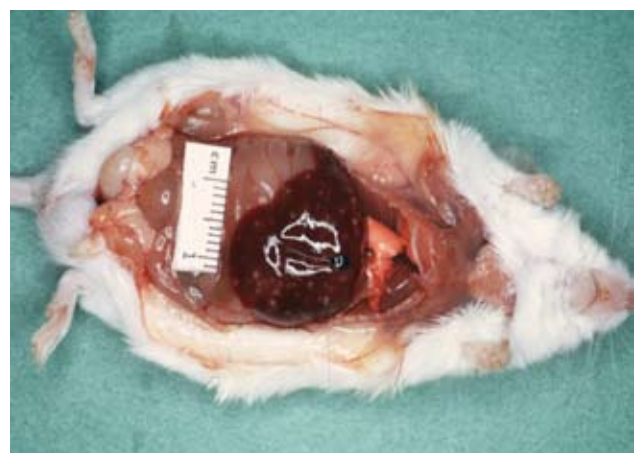


Figura 3. Necropsia de rata con signos clínicos característicos de infección por *Clostridium piliforme*. Se observa hepatomegalia y la presencia de focos de necrosis.

características de la enfermedad.

Con la tinción de Giemsa se observó la morfología típica de la bacteria. La presencia de esporos fue determinada con la tinción con Verde de malaquita. La IFI confirmó la presencia de *Clostridium piliforme* en las improntas de los órganos con lesiones procedentes de los animales con signología y no se observó la presencia del MO en las improntas de los órganos procedentes de ratas y ratones sin signología clínica.

Las dos especies inoculadas con 2×10^7 MO también desarrollaron signos clínicos típicos de la enfermedad como en la primera experiencia y se observaron las lesiones características descriptas. Las ratas y ratones que se inocularon con 2×10^5 y 2×10^6 MO no presentaron signos clínicos.

En los animales inoculados con 2×10^5 y 2×10^6 MO, sobrevivientes a la infección, la curva de Ac producidos se comportó igual en todas las cepas de ratas y ratones observándose el mayor título entre la sexta y séptima semana pi para decrecer abruptamente hasta hacerse no detectable en la 12^o semana pi.

No se observaron signos clínicos de la enfermedad en las cepas de ratas y ratones que se inocularon con 2×10^5 y 2×10^6 MO y que sobrevivieron a la infección y fueron desafiadas con una suspensión de 2×10^7 MO.

DISCUSIÓN

Hasta el año 1965, se pensaba que la enfermedad de Tyzzer afectaba sólo a los ratones. Experiencias realizadas por otros autores permitieron reproducir la enfermedad en conejos, hámsteres y meriones, observándose los signos clínicos y patológicos característicos que produce el MO. Posteriormente se demostró que los signos clínicos de la enfermedad de Tyzzer se observaban con más frecuencia en conejos meriones, hámsteres y cobayos, mientras que en la rata y el ratón de laboratorio la infección se presentaba en forma subclínica. Datos presentados por Fujiwara sugirieron la posibilidad de que alguna cepa de ratones y ratas sea más susceptible que otra sin embargo hasta el momento del desarrollo de este trabajo no se había determinado la susceptibilidad de las diferentes cepas de estas especies a la infección (2, 3, 4).

Para seleccionar la dosis infectante a utilizar se realizó una prueba piloto que permitió observar las manifestaciones clínicas y las lesiones patológicas en los animales. Se comprobó que dosis iguales o mayores a 2×10^7 MO producían signos clínicos en un período de tiempo corto que imposibilitaba la toma de muestra. Las muertes se sucedían durante la noche produciéndose autólisis que dificultaba el procesamiento de la muestra y la correcta evaluación de las lesiones histológicas.

Se observó que los ratones morían más rápidamente que las ratas. Los signos clínicos que mostraron todos los animales fueron coincidentes con los observados en otros animales de experimentación y citados por otros autores y se comprobó que la infección no siempre es subclínica (3, 7).

En los ratones los signos aparecían más temprano que en las ratas. Probablemente esto se debió a que para el caso de las ratas habría que haber utilizado una dosis infectante más alta. Como el objetivo del trabajo no era comparar en qué momento aparecían los signos en ambas especies sino que se pretendía determinar si había mayor o menor susceptibilidad entre las cepas de cada especie, se realizó la experiencia teniendo en cuenta el curso clínico observado en cada una de ellas.

Las lesiones encontradas no variaron significativamente entre ambas especies y entre cepas de la misma especie. Se comprobó que en la cepa coisogénica BALB/cNACKT el *Clostridium piliforme* causó lesiones cardíacas y no se observaron lesiones en hígado ni en intestino. No se puede concluir cuál fue la razón de por qué se dieron estos resultados, ya que al haberse inoculado por vía EV debería de haber llegado y producido lesiones en órganos peritoneales, dato que no pudo ser comprobado en ninguno de los animales inoculados de esta cepa aunque sí pudieron ser confirmados en las cepas BALB/c, AnN y BALB/cJ. Estos resultados abren un primer interrogante para futuras investigaciones.

En el caso de las ratas, no se encontraron diferencias entre las cepas, siempre se observaron manifestaciones clínicas y en ninguno de los casos hubo infección subclínica. Debería considerarse en futuros trabajos la posibilidad de inocular mayor concentración de MO, realizando controles de los animales en períodos más cortos de manera de comprobar si con mayores dosis también se producen las lesiones cardíacas.

Las técnicas utilizadas para la observación del MO y su morfología en las improntas resultaron específicas y sensibles.

Las dosis infectantes de 2×10^5 y 2×10^6 MO no produjeron signos clínicos pudiéndose inferir que se produjo una infección de tipo subclínica. Se observó que la inoculación de estas dosis en las dos especies y en todas las cepas estimuló la producción de Ac. En todos los casos la curva de Ac se comportó de manera idéntica. Estos Ac protegieron a los animales de una descarga de 2×10^7 MO que en la primera experiencia había resultado letal. La importancia de la dosis subletal protectora determinada nos permitirá en un futuro y mediante nuevos ensayos iniciar estudios de producción de vacunas para su uso en las colonias de ratas y ratones.

Del desarrollo de este trabajo se puede

concluir que: 1) todos los animales de las diferentes cepas de ambas especies resultaron ser susceptibles al agente productor de la enfermedad de Tyzzer, el *Clostridium piliforme*; 2) los ratones pertenecientes a la cepa coisogénica BALB/cNack fueron los únicos que no desarrollaron signos clínicos y lesiones características de esta enfermedad; 3) las concentraciones de 2×10^5 y 2×10^6 MO no produjeron mortalidad y estimularon la formación de Ac; 4) los Ac protegieron contra la descarga de la dosis letal de 2×10^7 MO; y 5) las propiedades biológicas del *Clostridium piliforme* fueron confirmadas.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. E Suzuki del Instituto Nacional de Salud de Japón (NIH-Japón) por haber cedido gentilmente la cepa de referencia utilizada en este estudio. El presente trabajo resume la Tesis de Doctorado de Miguel A Ayala, dirigido y codirigido por las Profesoras Cecilia Carbone y Cecilia M. Galosi.

BIBLIOGRAFÍA

1. Tyzzer EE. A fatal disease of Japanese waltzin mouse caused by a spore-bearing (*Bacillus piliformis* sp.) J Med Res 1917; 37: 307-338.
2. Fujiwara K. Tyzzer's disease. Jpn J Exp Med 1978; 48: 467-480.
3. Ganaway JR, Allen AM, Morre TD. Cultivation of *Bacillus piliformis* in mouse fibroblasts. Am J Pathol 1971; 64: 717-730.
4. Ikegami T, Shirota K, Une Y, Nomura Y, Wada Y, Goto K, Takakura A, Itoh T, Fujiwara K. Naturally occurring Tyzzer's disease in a calf. Vet Pathol 1999; 36: 253-255.
5. Hall WC, Kruiningen HT. Tyzzer disease in a horse. JAVMA 1974; 164: 1187-1189.
6. Duncan AJ, Carman RJ, Olsen GJ, Wilson KH. The agent of Tyzzer's disease is a *Clostridium* species. Clin Infect Dis 1993; 16 Suppl 4: S422.
7. Itho T, Kagiya N, Fujiwara K. Production of Tyzzer's disease in rats by ingestion of bacterial spores. Japan J Exp Med 1989; 59: 9-15.
8. Itho T, Kagiya N. Differences in susceptibility to peroral inoculation with *Bacillus piliformis* spores in mice and rats. Jikken Dobutsu 1990; 39: 425-428.
9. Weisbroth SH. Bacterial and micotic diseases. En: Baker HJ, Lindsey JR, Weisbroth SH (Eds). The Laboratory Rat Vol 1: Biology and Disease, New York Academic Press, 1979; p. 191-241
10. Nicklas W, Baneux P, Boot R, Decelle T, Deeny AA, Fumanelli M, Illgen-Wilcko B. Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. FELASA Working Group on Health Monitoring of Rodent and Rabbit Colonies. Lab Animals 2002; 36: 20-42.
11. Milocco SN, Zuñiga J. Ciencia y Tecnología en protección y experimentación animal. Ed Mc Graw Hill, 2001.
12. Manual of Microbiologic Monitoring of Laboratory Animals. Second Edition. Editors U.S. Department of Health and Human Service, National Institute of Health. 1994.
13. Spencer TH, Ganaway JR, Waggle KS. Cultivation of *Bacillus piliformis* (Tyzzer) in mouse fibroblasts (3T3 cells). Vet Microbiol 1990; 22 (2-3): 291-297.
14. Schaich Fries A. Studies on Tyzzer's disease, isolation and propagation of *Bacillus piliformis*. Lab Animals 1977; 11: 75-78.