

Valutazione della sicurezza locale e generale della somministrazione in singola dose del vaccino Suvaxyn® Circo+MH RTU nel suino allevato in condizioni di campo in Italia



A. MANFREDDA³, M. MARANGI¹, F. SOLARI BASANO², R. NAZZARI², F. TONI³

¹ Medico Veterinario Libero Professionista, Via Carrobbio 17, 25062 Concesio (BS)

² Arcoblu s.r.l., Via Milesi 5, 20133 Milano

³ Zoetis Italia s.r.l., Via Andrea Doria, 41 M, 00192 Roma

RIASSUNTO

Uno studio clinico controllato, randomizzato, in cieco, è stato condotto sulla base delle buone pratiche di sperimentazione clinica dei medicinali veterinari (VICH-GL9 GCP) per valutare la sicurezza del vaccino Suvaxyn® Circo+MH RTU nel suinetto. Nello studio sono stati arruolati 210 ibridi commerciali di 28 giorni: 71 sono stati assegnati al gruppo G1 (Suvaxyn Circo+MH RTU®), 69 al gruppo G2 (Porcilis PCV M Hyo®) e 70 al gruppo CG (NaCl 0,9%). Quattro ore dopo la vaccinazione e ai giorni 1, 2, 3, 4, 7 e 14, gli animali sono stati sottoposti a visita clinica. A 4 ore dalla vaccinazione gli animali del gruppo G1 e G2 hanno mostrato una temperatura rettale media superiore al gruppo di controllo (CG) e si è osservata una differenza significativa (39,7° e 40,2° rispettivamente, $p < 0,0001$) tra i gruppi G1 e G2. In G2 la temperatura si è mantenuta superiore al gruppo controllo CG anche il giorno successivo al trattamento. A 4 ore dalla vaccinazione la percentuale di animali con temperatura rettale $\geq 40^\circ\text{C}$ era superiore nel gruppo G2 (63,8%) rispetto a G1 (29,6%) ed in entrambi i gruppi superiore al CG. Al giorno 1, la percentuale di animali con temperatura rettale $\geq 40^\circ\text{C}$ in G2 (30,4%), è rimasta superiore a quanto osservato in G1 (19,7%) e in CG (14,3%). Le reazioni locali sono state di natura lieve, consistenti in un ponfo indolore di diametro $\leq 0,5$ cm e si sono risolte tutte entro 24 ore, ad eccezione di un caso in G2 in cui la scomparsa della lesione si è verificata in seconda giornata. La percentuale di animali con reazione al sito di inoculo in G2 (rispettivamente 7,2% e 5,8%) è risultata superiore rispetto al controllo a 4 ore dalla vaccinazione ed al giorno 1, mentre nessuna differenza è stata osservata per gli animali in G1 (rispettivamente 1,4% e 2,8%). Suvaxyn Circo+MH RTU® ha dimostrato una elevata sicurezza locale e generale inducendo alterazioni della temperatura rettale contenute e transitorie ed un numero di reazioni al sito di inoculo inferiori rispetto al prodotto di riferimento.

PAROLE CHIAVE

Vaccino, Circovirus, *Mycoplasma* spp., suino, sicurezza.

INTRODUZIONE

Le infezioni da Circovirus suino tipo 2 (PCV2) e il “complesso della malattia respiratoria del suino” (PRDC) rappresentano le principali cause di malattia e di perdita economica dell'allevamento del suino. L'infezione da PCV2^{1,2} è associata alla “sindrome multisistemica post-svezzamento” (PMWS), alla “dermatite-nefrite del suino” (PNDS) e in alcuni casi al “complesso delle malattie respiratorie del suino” (PRDC)³ che vede il coinvolgimento di una componente virale (PCV2, Virus della sindrome riproduttiva e respiratoria del suino, Virus influenzali) e può comprendere diverse specie batteriche (*Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*) e *Mycoplasma hyopneumoniae*^{4,5,6,7}.

Le vaccinazioni nei confronti di PCV2 e di *M. hyopneumoniae* sono comunemente impiegate per il controllo delle forme sostenute da questi microrganismi nell'allevamento suino⁸. Suvaxyn® Circo+MH RTU è un vaccino iniettabile, costituito

dalla combinazione di un ricombinante chimerico del Circovirus porcino di tipo 1, contenente la componente antigenica proteica ORF2 con antigeni inattivati di *Mycoplasma hyopneumoniae* (Ceppo P-5722-3). L'impiego del prodotto è stato recentemente autorizzato dalla Commissione Europea e ne è stata concessa l'autorizzazione all'immissione in commercio in Italia, per l'immunizzazione attiva nei confronti di Circovirus suino tipo 2 (PCV2) e di *M. hyopneumoniae*.

Il vaccino, impiegato in soggetti di età superiore alle tre settimane, è in grado di ridurre la carica virale da PCV2 nel sangue e nei tessuti linfoidi nonché la diffusione fecale del virus causata dall'infezione. La componente antigenica di *M. hyopneumoniae* riduce la comparsa delle lesioni polmonari associate all'infezione. L'immunità insorge tre settimane dopo la vaccinazione ed ha una durata di 23 settimane nei confronti di PCV2 e di 16 settimane nei confronti di *M. hyopneumoniae*.

Lo scopo di questo studio, condotto in condizioni di campo, è stato quello di valutare la sicurezza⁹ della singola somministrazione intramuscolare di Suvaxyn Circo+MH RTU®, impiegato secondo i contenuti del foglietto illustrativo, in suinetti di almeno 3 settimane di età nelle normali condizioni di allevamento in Italia confrontandolo con un gruppo controllo positivo vaccinato con un prodotto analogo (Porcilis PCV M Hyo®) e con un gruppo controllo negativo.

Autore per la corrispondenza:

Andrea Manfredda (andrea.manfredda@zoetis.com).

Tabella 1 - Riassunto del disegno sperimentale.

Gruppo	Trattamento	Dose	Via di somm.	Numero di animali	Giorno di trattamento	Visite cliniche
G1	Suvaxyn Circo+MH RTU®	2 ml	IM	71	0	0, 1, 2, 3, 4, 7 e 14
G2	Porcilis PCV M Hyo®	2 ml	IM	69	0	
CG	NaCl 0,9% Soluz. sterile	2 ml	IM	70	0	

MATERIALI E METODI

Lo studio randomizzato, in cieco con controllo negativo e positivo, è stato condotto sulla base delle Buone Pratiche di Sperimentazione Clinica dei Medicinali Veterinari^{10,11} su prodotti commerciali somministrati secondo i contenuti del foglietto illustrativo, a soggetti gestiti in base alla normale pratica aziendale. Gli animali sono stati inseriti nello studio dopo l'ottenimento del consenso informato del proprietario. Un riassunto del disegno sperimentale è riportato in Tabella 1.

Lo studio è stato condotto in un allevamento suinicolo a ciclo chiuso situato nella provincia di Brescia, che produce circa 5000 suini all'anno destinati alla produzione di prosciutto di Parma ed ha coinvolto 210 suinetti ibridi commerciali (106 femmine e 104 maschi), svezzati di 4 settimane di età. Allo svezzamento, le scrofe sono state allontanate dai box di lattazione e i suinetti sono stati mantenuti nei box della sala parto per circa 30 giorni. Gli animali erano ricoverati in box da 2,3 x 1,8 m contenenti un massimo di 12 capi (0,36 m²/capo) rispondenti ai requisiti previsti dalla direttiva del consiglio EU 91/630/EEC-19/11/91.

I suinetti sono stati inseriti nello studio solo se in condizioni di salute normali, di età superiore alle tre settimane, esenti da lesioni ai siti di inoculo, non trattati con prodotti ad attività immunologica (immunomodulatori, immunosoppressori o immunostimolanti) prima dell'inserimento e per i quali non era applicabile nessuna delle controindicazioni contenute sul foglietto illustrativo dei prodotti impiegati.

All'inserimento nello studio (Giorno 0) a ciascun animale è stato assegnato un identificativo univoco riportato su una marca identificativa applicata sul padiglione auricolare. Ciascun suinetto è stato quindi sottoposto a visita clinica comprendente la valutazione dello stato generale di salute, la rilevazione della temperatura rettale e la valutazione del sito di inoculo mediante ispezione e palpazione.

Ciascun segno clinico al sito di inoculo è stato codificato in base allo schema riportato sotto.

Al termine della visita clinica ciascun animale è stato assegnato al gruppo di trattamento utilizzando una tavola di as-

segnazione random al trattamento. Ciascun suino è stato assegnato ad un blocco di tre soggetti e, all'interno di ciascun blocco, ad uno dei tre gruppi di trattamento in modo da mantenere numerosità simili nei tre gruppi, quindi si è proceduto alla somministrazione di uno dei tre prodotti previsti in base al gruppo di appartenenza (Suvaxyn Circo+MH RTU®, o Porcilis PCV M Hyo®, o soluzione fisiologica). I prodotti sono stati utilizzati secondo le istruzioni e restrizioni riportate sui relativi foglietti illustrativi e somministrati per via intramuscolare nella regione destra del collo, dietro l'orecchio, utilizzando una siringa multi dose e aghi monouso sterili 18G 5/8, (1,2 mm x 15 mm), avendo l'accortezza di utilizzare un ago nuovo per ciascun soggetto. Gli animali sono stati sottoposti a valutazione del sito di inoculo 4 ore (\pm 1) dopo la somministrazione del prodotto sperimentale.

Ogni animale è stato quindi rivisitato nei 4 giorni successivi (Giorni 1, 2, 3 e 4). In caso di febbre (T. rettale > 40,5°C) o in presenza di una reazione al sito di inoculo al giorno 4, la misurazione della temperatura e la valutazione del sito di inoculo sono state ripetute fino al ritorno alla normalità. Ai giorni 7 e 14 sono state eseguite soltanto le valutazioni del sito di inoculo. Durante tutto lo studio dal giorno 0 (post trattamento) al giorno 28, gli animali sono stati sottoposti ad osservazione giornaliera per la valutazione delle condizioni dello stato generale di salute e, in caso di alterazioni, sottoposti a visita clinica. In presenza di patologie si è provveduto alla registrazione del decorso clinico nonché di eventuali trattamenti concomitanti ed alla valutazione di possibili correlazioni con la somministrazione dei prodotti testati. Lo studio si è concluso per ciascun animale 28 giorni dopo la vaccinazione.

La valutazione della sicurezza si è basata sulla percentuale di soggetti con lesioni al sito di inoculo e sulla media della temperatura rettale ai diversi momenti dello studio, confrontando i due gruppi vaccinati con il gruppo di controllo. I punteggi delle lesioni al sito di inoculo sono stati riassunti.

Il singolo animale è stato scelto come unità sperimentale. La percentuale di reazioni al sito di inoculo per gruppo di trattamento è stata calcolata come segue: % Reazioni sito inoculo = (numero di animali con reazione al sito di inoculo/ nume-

Schema

Segno clinico	Punteggio
Arrossamento	0 = Non visibile, 1 = Visibile.
Gonfiore	0 = Non visibile e non palpabile, 1 = Visibile e/o palpabile.
Dimensioni	0 = Non visibile e non palpabile, 1 = Piccola area rilevata, limitata solo al punto di inoculo (diametro \leq 0,5 cm), 2 = Diametro > 0,5 e \leq 2 cm, 3 = Diametro > 2 e \leq 5 cm, 4 = Diametro > 5 cm ma limitato all'area intorno al sito di inoculo, 5 = Gonfiore generalizzato all'intera area del collo.
Dolore	0 = Nessun dolore alla palpazione, 1 = Dolore alla palpazione.
Calore	0 = Nessun aumento della temperatura al sito di inoculo rilevata mediante palpazione, 1 = Aumento della temperatura al sito di inoculo rilevata mediante palpazione.

ro di animali inseriti nello studio) x 100. I dati di ciascun gruppo sono stati confrontati attraverso il Test Esatto di Fisher. Le medie delle temperature rettali ed il numero di animali con temperature rettali superiori a 40°C sono state calcolate ai diversi time-point dello studio e confrontati tra i gruppi di trattamento rispettivamente mediante ANOVA per misure ripetute e Test Esatto di Fisher. Nel corso delle analisi sono stati verificati gli assunti di distribuzione e omogeneità per le misure continue e utilizzati gli assunti statistici standard ($P=0,8$ e $=0,05$)¹².

RISULTATI

Temperatura rettale

I dati relativi alle temperature rettali degli animali di ciascun gruppo ai diversi time-point dello studio sono riassunti in Tabella 2.

Prima della somministrazione del trattamento le temperature corporee sono risultate omogenee tra i gruppi (ANOVA, $p=0,4877$) e con distribuzione normale (Media=39,6, Dev. St.=0,36, 95% IC=39,525-39,624. Shapiro Wilk W Test $p=0,0033$) che si è mantenuta per tutta la durata dello studio. A 4 ore (± 1) dalla vaccinazione gli animali del gruppo G1 hanno mostrato una temperatura rettale media di 39,7°C, leggermente superiore, anche se in maniera significativa, ai soggetti del gruppo di controllo (39,5°C, $p=0,0267$). Gli animali del gruppo G2 hanno manifestato una temperatura rettale media di 40,2°C, significativamente superiore a quella dei soggetti di controllo (39,5°C, $p<0,0001$), come già riportato precedentemente¹³ e a quelli appartenenti al gruppo G1 (39,7°C, $p<0,0001$).

Il giorno successivo al trattamento i soggetti del gruppo G1 hanno mostrato una temperatura rettale media di 39,6°C,

del tutto simile a quella registrata nel gruppo di controllo, mentre gli animali del gruppo G2 presentavano una temperatura rettale media di 39,9°C, significativamente superiore sia al gruppo di controllo (39,7°C, $p=0,0006$), come già riportato precedentemente¹³, che al gruppo G1 (39,6°C, $p=0,0003$). Nei giorni successivi le temperature rettali degli animali vaccinati di entrambi i gruppi non hanno mostrato alterazioni significative rispetto al controllo.

In Tabella 3 è riportato il numero di animali con temperatura rettale $\geq 40^\circ\text{C}$ ai diversi tempi dello studio. A 4 ore (± 1) dalla vaccinazione il 29,6% dei soggetti in G1 e il 63,8% in G2 presentavano temperatura rettale $\geq 40^\circ\text{C}$. La differenza tra i gruppi è risultata significativa ($p<0,0001$) così come il confronto con il gruppo di controllo. Il giorno successivo alla vaccinazione la percentuale di animali in G2 con temperatura rettale $\geq 40^\circ\text{C}$ è stata del 30,4% ($p=0,0222$). Nessuna differenza si è osservata per gli animali in G1 rispetto al gruppo di controllo.

Reazioni al sito di inoculo

Il numero dei soggetti che hanno manifestato reazioni al sito di inoculo è riportato in Tabella 4. Le reazioni osservate sono state di natura lieve, consistenti in un ponfo limitato al punto di inoculo con diametro $\leq 0,5$ cm, indolore, freddo e non arrossato e si sono risolte tutte entro 24 ore, ad eccezione di un caso nel gruppo G2 nel quale la scomparsa della lesione si è verificata in seconda giornata. Nel gruppo G1 non si è osservata alcuna differenza significativa rispetto al gruppo di controllo. Nel gruppo G2 sono state osservate reazioni nel 7,2% dei soggetti a 4 (± 1) ore dal trattamento e nel 5,8% dei suinetti il giorno successivo al trattamento. In entrambi i casi il numero di reazioni è stato significativamente superiore rispetto al gruppo di controllo, generalmente in linea con i dati riportati in bibliografia¹³.

Tabella 2 - Riassunto delle temperature corporee rilevate ai diversi tempi dello studio.

Gruppo		Giorno 0 Pre trattam.	Giorno 0 Post trattam.	Giorno 1	Giorno 2	Giorno 3	Giorno 4
G1	Media	39,6	39,7 ^{(a)(b)}	39,6 ^(d)	39,3	39,4	39,4
	Dev. Std.	0,36	0,54	0,39	0,45	0,34	0,30
	Err. Std	0,04	0,06	0,05	0,05	0,04	0,04
	95% IC	39,494-39,666	39,591-39,848	39,534-39,720	39,196-39,408	39,326-39,485	39,345-39,488
G2	Media	39,5	40,2 ^{(b)(c)}	39,9 ^{(d)(e)}	39,4	39,4	39,4
	Dev. Std.	0,37	0,64	0,34	0,31	0,33	0,36
	Err. Std	0,04	0,08	0,04	0,04	0,04	0,04
	95% IC	39,445-39,624	40,042-40,350	39,776-39,937	39,311-39,458	39,363-39,524	39,267-39,438
CG	Media	39,6	39,5 ^{(a)(c)}	39,7 ^(e)	39,4	39,5	39,4
	Dev. Std.	0,36	0,35	0,35	0,40	0,28	0,32
	Err. Std	0,04	0,04	0,04	0,05	0,03	0,04
	95% IC	39,523-39,694	39,464-39,630	39,568-39,735	39,331-39,521	39,463-39,597	39,344-39,499

(a): $p=0,0267$, (b): $p<0,0001$, (c): $p<0,0001$, (d): $p=0,0003$, (e): $p=0,0006$

Tabella 3 - Numero di soggetti con temperatura rettale $\geq 40^\circ\text{C}$ ai diversi tempi dello studio.

Gruppo	N	Giorno 0 Pre trattam.	Giorno 0 Post trattam.	Giorno 1	Giorno 2	Giorno 3	Giorno 4
G1	71	8 (11,3%)	21 (29,6%) ^{(a)(b)}	14 (19,7%)	6 (8,5%)	2 (2,8%)	2 (2,8%)
G2	69	8 (11,6%)	44 (63,8%) ^{(a)(c)}	21 (30,4%) ^(d)	1 (1,4%)	3 (4,3%)	1 (1,4%)
CG	70	8 (11,4%)	6 (8,6%) ^{(b)(c)}	10 (14,3%) ^(d)	4 (5,7%)	2 (2,9%)	4 (5,7%)

(a): $p<0,0001$, (b): $p=0,0013$, (c): $p<0,0001$, (d): $p=0,0222$.

Tabella 4 - Numero di soggetti con reazioni al sito di inoculo ai diversi tempi dello studio.

Gruppo	N	Giorno 0 Pre trattam.	Giorno 0 Post trattam.	Giorno 1	Giorno 2	Giorno 3	Giorno 4
G1	71	0	1 (1,4%)	2 (2,8%)	0	0	0
G2	69	0	5 (7,2%) ^(a)	4 (5,8%) ^(b)	0	0	1 (1,5%)
CG	70	0	0 ^(a)	0 ^(b)	0	0	0

(a): $p=0,0218$, (b): $p=0,0409$.

Eventi avversi

Durante lo studio sono stati osservati eventi avversi in 17 soggetti. Un suinetto in G1 ha mostrato deperimento ed è guarito in due giorni dopo trattamento con 1,5 ml di Do-betin® B1 (vitamina B1 e B12) per via intramuscolare sid. Tre soggetti in G1, 10 in G2 e 3 in CG sono stati colpiti da una sindrome enterica da *E. coli* e sottoposti a trattamento antibiotico con una cefalosporina (cefquinome) somministrata per via intramuscolare sid e sono guariti in due giorni. Nessuno degli eventi avversi osservati durante lo studio è risultato riconducibile alla somministrazione dei vaccini impiegati.

DISCUSSIONE

La somministrazione di entrambi i vaccini si è dimostrata sicura. Entrambi non hanno dato reazioni sistemiche se si esclude un transitorio rialzo termico nelle ore successive alla vaccinazione che si è risolto in prima giornata, negli animali vaccinati con Suvaxyn Circo+MH RTU®, ed in seconda giornata, per gli animali vaccinati con Porcilis PCV M Hyo®, diversamente dai dati riportati in bibliografia⁷. La comparsa di lesioni al sito di inoculo (piccoli ponfi transitori, indolori, freddi e non arrossati) del primo prodotto è stata sporadica e priva di significatività se confrontata con il gruppo di controllo, mentre la somministrazione di Porcilis PCV M Hyo® ha dato luogo alla comparsa di reazioni locali di natura lieve in una limitata percentuale di soggetti che si sono risolte nell'arco di 24-48 ore, diversamente da quanto riportato in bibliografia¹⁴.

CONCLUSIONI

Nel confronto tra i due prodotti è emersa una superiorità nella sicurezza di Suvaxyn Circo+MH RTU® sia per quanto riguarda l'incremento della temperatura rettale, sia per numero di suinetti interessati, nelle prime 24 ore dalla vaccinazione. Inoltre Suvaxyn Circo+MH RTU® ha determinato nello stesso periodo di tempo un numero significativamente minore di reazioni al sito di inoculo rispetto a Porcilis PCV M Hyo®.

RINGRAZIAMENTI

Gli autori desiderano ringraziare il personale della Azienda Agricola Mostarda Bruno, Via Campagna 5, 25011 Calcinato, Brescia, per la disponibilità e per la collaborazione dimostrata nel corso dello studio.

■ Evaluation of the local and general safety of a single administration of Suvaxyn® Circo+MH RTU vaccine in swine reared in field condition in Italian swine production

SUMMARY

To evaluate the safety of the administration of Suvaxyn® Circo+MH RTU vaccine in piglets, a blinded, randomised, controlled clinical trial was carried out. The study was conducted, according to Good Clinical Practices (VICH-GL9/GCP) on 210 commercial hybrid piglets of 28 days of age; 71 animals were assigned to group 1 (G1, Suvaxyn Circo+MH RTU®), 69 to group 2 (G2, Porcilis PCV M Hyo®) and 70 to group 3 (CG, NaCl 0.9%). Four hours following vaccination and on days 1, 2, 3, 4, 7 e 14, animals were physically examined. Four hours following vaccination, animals in groups G1 (39.7°) and G2 (40.2°) showed an average rectal temperature significantly higher than the animals of control group (CG 39.5°) and a significant difference ($p<0.0001$) was observed between G1 and G2. In G2 the temperature remained higher than CG, also the day following vaccination. Four hours following vaccination the percentage of animals with rectal temperature $\geq 40^{\circ}\text{C}$ was higher in G2 (63.8%) when compared to G1 (29.6%) and in both groups it was higher than CG (8.6%). On day 1 the percentage of animals with rectal temperature $\geq 40^{\circ}\text{C}$ in G2 (30.4%) was higher than in G1 (19.7%) and CG (14.3%). Local reactions were mild and resulted in a small, painless bump (≤ 0.5 cm diameter) and recovered in 24 hours except in one piglet in G2 where the lesion disappeared on day 2. The percentage of animals showing injection site reactions in G2 (7.2% and 5.8% respectively) was higher than CG (0% and 0% respectively) four hours following vaccination and on day 1, while no significant differences were recorded for G1 (1.4% and 2.8% respectively) animals. Suvaxyn Circo+MH RTU® showed a good local and general safety inducing a mild and transient increase of rectal temperature and a lower number of injection site reactions when compared with the reference product.

KEY WORDS

Vaccine, Circovirus, *Mycoplasma* spp., swine, safety.

Bibliografia

- Petrini S., Paniccia M., Gavaudan S., Simoni E., Sensi M., Filippini G., Rigotti L., Fortunati M., Ferrari M., De Mia G.M. (2011) Principali malattie associate all'infezione da Circovirus suino tipo 2 (PCV2). Large Animal Review 17:89-98.

2. Franzo G., Cortey M., Olvera A., Novosel D., Marnie A., Gomes De Castro M., Biagini P., Segales J., Drigo M. (2015) Revisiting the taxonomical classification of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virol J*, 2015; 12:131.
3. Opriessing T., Thacker E.L., Yu S., Fenaux M., Meng X.J., Halbur P.G., (2004) Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with mycoplasma hyopneumoniae and porcine circovirus type 2. *Vet Pathol*, 2004 Nov; 41(6):624-40.
4. Thacker E.L and Minion F.C. (2012) Mycoplasmosis. In: Diseases of swine, Ed. Zimmerman J.J, Karriker L.A., Ramirez A., Schwartz K.J., Stevenson G.W, 10th ed., John Wiley & Sons, Inc., p. 779-797.
5. Kekarainen T., Segales J. (2015) Porcine circovirus 2 immunology and viral evolution. *Porcine health manag*, 2015; 1:17.
6. Nathues H., Doehring S., Woeste H., Fahrion A.S., Doherr M.G., Grosse Beilage E. (2013) Individual risk factors for Mycoplasma hyopneumoniae infections in suckling pigs at the age of weaning. *Acta vet Scand*, 2013; 55(1):44.
7. Maes D., Verdonck M., Deluyker H., De Kruijff A. (1996) Enzootic pneumonia in pigs. *Vet quart*, 1996; 18:104-109.
8. Maes D., Segales J., Meyns T., Sibila M., Pietes M., Haesebrouck F. (2008) Control of mycoplasma hyopneumoniae infections in pigs. *Vet Microbiol*, 2008; 126:297-309.
9. Woodland R. (2011) European regulatory requirements for veterinary vaccine safety and potency testing and recent progress towards reducing animal use. *Procedia vaccinol - volume 5*, 2011, pages 151-155.
10. Buone pratiche di sperimentazione clinica dei medicinali veterinari sugli animali/Gazzetta ufficiale Della Repubblica Italiana, Ministero Della Salute n. 291 del 12/11/2011.
11. CVMP/VICH/595/1998 - VICH GL 9: Good Clinical Practice.
12. EMA/CVMP/EWP/81976/2010 - Guideline on statistical principles for clinical trials for veterinary medicinal products.
13. Wituliet M., Holtslag H., Nell T., Segers R., Fachinger V. (2015) Efficacy and safety of a combined porcine circovirus and mycoplasma hyopneumoniae vaccine in finishing pigs. *Trials vaccinol - volume 4*, 2015, pages 43-49.
14. Kaalberg L., Geurts V., Jolie R. (2017) A field efficacy and safety trial in the Netherlands in pigs vaccinated at 3 weeks of age with a ready to use porcine circovirus type 2 and mycoplasma hyopneumoniae combined vaccine. *Porcine health manag*, 2017, pages 3-23.