

Van variolatie naar het cultuurvaccin volgens Frenkel

Een tocht door de ontwikkelingsgeschiedenis van een vaccin

Gro Vlaspolder

Historisch gezien zijn de pokken, of variola, de grootste plaag die de wereld heeft gekend. Variola is afgeleid van het Latijnse woord 'varius', dat 'bevekt' betekent, of 'varus', dat staat voor 'tekenen op de huid'. De term pokken (smallpox, poeke betekent 'zak') werd voor het eerst gebruikt in Engeland aan het einde van de 15e eeuw, om onderscheid te kunnen maken met syfilis, dat toen bekend stond als 'de grote pokken'.^[1]

De dienaar en de prediker

Wanneer de pokken voor het eerst optraden is niet bekend, maar dat met de komst van de ziekte daarmee ook de strijd ertegen begon, staat vast. Een belangrijke waarneming was dat iemand die de pokken had doorstaan, het meestal geen tweede keer kreeg. Deze waarneming leidde tot pogingen van actieve immunisering voor de ziekte, bijvoorbeeld door iemand te infecteren met de korsten van pokpuisten van een pokkenpatiënt. In China werden deze korsten verpulverd en met andere kruiden in de neus ingebracht. In India haalde men draadjes die door het vocht van pokkenblaasjes waren gehaald, door een aangebrachte incisie bij de te immuniseren persoon. De methode werd beoefend in tempels waar men de godin vereerde die bescherming verleende tegen deze ziekte.^[2]

Het is mogelijk dat in West-Afrika juist de dwingende, ziekte veroorzakende krachten van een god genaamd Sakpata – de god van de pokken en van de aarde – ertoe hebben geleid dat men snel een

effectieve methode ontwikkelde om zich te beschermen tegen de pokken. De techniek van inoculatie of variolatie, waarbij vocht uit pokkenblaasjes via een kleine, oppervlakkige incisie van de te immuniseren persoon werd ingebracht, is in Noord-Amerika geïntroduceerd door de uit Afrika afkomstige Onesimus. In 1706 leerde de Puritijnse prediker Cotton Mather uit Boston de techniek van deze tot slaaf gemaakte man, die het litteken op zijn arm liet zien als bewijs dat hij was geïnoculeerd en niet vatbaar was voor de ziekte. Ondanks dat Cotton Mather bij het introduceren in de medische wereld op weerstand stuitte, vond hij uiteindelijk steun bij de arts Zabiel Boylston, die zijn zes jaar oude zoon en twee van zijn slaven inoculeerde.^[3] Een soortgelijk verhaal kennen we over de introductie in Europa door de Engelse ambassadeursvrouw Lady Mary Worthley Montague, die variolatie en de effecten ervan voor het eerst in Constantinopel te zien kreeg.

De inoculator

Rond 1743 kwam de inoculatiemethode in algemeen gebruik.^[2] De techniek werd verder verbeterd door de familie Sutton, waardoor rond

Universitair Medisch Centrum Groningen,
Groningen, afdeling Medische Microbiologie en
Infectiepreventie (MMBI), G.L. Vlaspolder, aios
medische microbiologie. Correspondentieadres:
g.l.vlaspolder@umcg.nl

1760 het aantal inoculaties enorm toenam. Robert Sutton senior veranderde de techniek dusdanig dat er alleen een kleine oppervlakkige snede in de huid werd gemaakt; hij maakte hierbij gebruik van een lancet. Zijn zoon Daniel zorgde echter voor de verdere verspreiding van hun techniek en zette samen met zijn broers en enkele partners een franchiseketen op in Engeland, een deel van Europa en Noord-Amerika, waarin de 'Suttoniaanse methode' werd aangeboden.

Geheel onterecht was het niet; Sutton behaalde met zijn variolatie een indrukwekkende reductie in mortaliteit. Daniel inoculeerde tussen 1763 en 1766 22.000 mensen, van wie er slechts drie overleden.[4] Normaliter lag de mortaliteit van variolatie rond de 2 tot 10 procent.[2]

Hoewel Daniel Sutton nooit een medische opleiding had genoten, was hij een nauwkeurige observator en vroeg hij zich af waarom de punctiemethode van zijn vader zo succesvol was.

Via enkele experimenten met de inoculatietechniek – die varieerden van het maken van diepere incisies en het achterlaten van een met pokstof geïmpregneerde draad (zonder dat er contact was geweest met de huid), tot het inwrijven van de incisie met bloed van met pokken geïnfecteerde patiënten bij de te inoculeren persoon – ontdekte hij dat het essentieel was dat de pokstof contact maakte met de huid. In deze experimenten verrichtte hij de conventionele variolatie op de andere arm en vergeleek hij de lokale huidreactie, waarbij de conventionele methode een huidreactie opleverde zoals te verwachten was en de te onderzoeken methode geen huidreactie opleverde.

In 1796 publiceerde Sutton zijn observaties, ideeën en bevindingen over inoculatie van de pokken in zijn autobiografie *De Inoculator*. Door zijn perfectionisme en het ieder jaar aanpassen en bijschaven van zijn bevindingen publiceerde hij het boek veel te laat. De wetenschappelijke focus lag inmiddels niet meer bij de variolatie, maar werd gedomineerd door Edward Jenner en zijn onderzoek naar inoculatie met pus uit koeienpokken. Jenner's naam is

onlosmakelijk verbonden aan vaccinatie. Hij bestudeerde de entreacties bij de mens met koepokstof die hij 'variola vaccinae' noemde, en publiceerde zijn bevindingen in 1798, wat een baanbrekende publicatie werd.

Van gehumaniseerde lymfe terug naar animale lymfe

Aanvankelijk entte men van arm op arm en werd de entstof bewaard aan draadjes die men door de pokkenblaasjes haalde en daarna droogde.

Tijdens de pokkenepidemie van 1820 zag men dat gevaccineerden een milde uiting van de pokziekte doorliepen, variolois genaamd, wat maakte dat er twijfel ontstond over de levenslange immuniteit die vaccinatie zou moeten opwekken. De oorzaak van de verzwakking van de pokstof was niet geheel duidelijk, maar een verklaring zou kunnen zijn dat de gehumaniseerde lymfe 'verzwakte' vanwege het passeren van de entstof van mens op mens. Door de pokstof weer via runderen te laten passeren probeerde men de werkzaamheid te verbeteren.[2] Vanaf 1865 werd zuiver animale entstof gebruikt.[5] Hierdoor werd het ook mogelijk om het virus op grote schaal te gaan produceren. Er ging echter nog veel tijd overheen voordat men volledig overging op het vervaardigen van vaccins met uitsluitend animale lymfe; op zijn minst tot in 1880 werden beide vaccins naast elkaar gebruikt.[2,5]

Met de mogelijkheid het virus op grote schaal te produceren voor de vervaardiging van vaccins, kwam men voor nieuwe uitdagingen te staan. De houdbaarheid van niet-steriele entstof bleek een groot probleem, waardoor het houden van voorraden beperkt was, terwijl dit juist noodzakelijk was voor de bestrijding van eventuele epidemieën. Door de toepassing van glycerine in de vaccinbereiding verbeterde de houdbaarheid. Naast de conserverende werking bleek glycerine ook een bactericide werking te hebben.

Na de ontdekking van penicilline in 1928 en uiteindelijk ook de mogelijkheid tot productie en inzet op grote schaal hiervan, was te verwachten dat

antibiotica op den duur ook zouden worden toegepast in de bereiding van het animale lymfeyaccin.

Klassieke kalverlymfeyaccin en het cultuurvaccin volgens Frenkel

Het klassieke kalverlymfeyaccin werd aanvankelijk bereid door de huid van de buik of thoraxwand van klinisch gezonde kalveren te scheren, desinfecteren en infecteren met het vacciniavirus. Wanneer de pokken zich na vier tot vijf dagen hadden ontwikkeld, werden de pokken bij het kalf geogost. Om er zeker van te zijn dat het kalf gezond was, werd bacteriologisch onderzoek verricht. Tevens vond er een sectie plaats nadat het kalf was geslacht. Pas wanneer bleek dat het kalf gezond was geweest, kon de verkregen pokstof worden gebruikt voor een vaccin. Maar ondanks het toevoegen van desinfectantia zoals glycerol of fenol en de behandeling met antibiotica, was het onmogelijk het vaccin volledig vrij van micro-organismen te krijgen. Daarnaast bevatte de pokstof leukocyten, dood huidmateriaal en andere bloedbestanddelen van het kalf.[6]

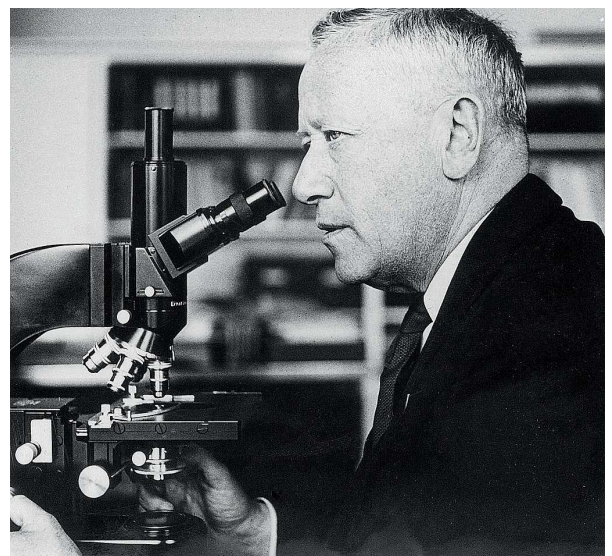
Het produceren van een primair, bacterievrij vaccin bleef een uitdaging. Voor enkele virussen bleek het kweken in bebroede voegeieren een oplossing. Voor het vacciniavirus lukte het Ernst William Goodpasture via deze methode een vaccin vrij van bacteriën te verkrijgen, hoewel het vaccin nog wel ontstekingsproducten bevatte.[2,6]

Ook werden bacterievrije entstoffen vervaardigd door het gebruik van de inwendige organen van proefdieren, zoals zenuwweefsel. Een dergelijk neurovaccin werd ook vervaardigd voor de pokken door Eduardo Gallardo in 1934. In Spanje werden honderdduizenden kinderen gevaccineerd, zonder dat de meest ernstige complicatie van het pokkenvaccin optrad; encefalitis postvaccinalis. Deze complicatie bij toepassing van dit vaccin werd in Nederland echter wel gezien.[2] Daarnaast verliep de huidreactie bij kinderen ouder dan zes jaar heftiger, waarbij de reactie zich kon uitbreiden tot over de gehele arm, gepaard gaande met lymfadenopathie en koorts.[7]

Een andere methode om het vacciniavirus steriel te kweken was de weefselkweek. De eerste poging tot het in weefselculturen kweken van het vacciniavirus dateert uit 1930. Herman Salomon Frenkel, dierenarts en hoofd van de Veterinaire afdeling (figuur 1) slaagde erin technieken te ontwikkelen om het mond-en-klauwzeervirus in foetaal huidweefsel van runderen te kweken. Op basis van dit concept trachtte hij samen met zijn collega Gerard Martinus van Waveren (1938) het vacciniavirus te kweken. Later heeft Frenkel samen met de arts Jacoba Kapsenberg (figuur 2) de methode verder uitgewerkt voor productie op grotere schaal.

Frenkel en Van Waveren gebruikten onder andere runderamniovloeistof als medium voor het in vitro kweken van het mond-en-klauwzeervirus.

Dit leek de ideale vloeistof te zijn om het huidweefsel van de foetus in goede staat te houden en het zorgde voor een hoge virustiter.



Figuur 1. H.S. Frenkel, dierenarts en hoofd van de Veterinaire afdeling. Foto: J. Lokker, ca. 1955.
Bron: Trefpunt Medische Geschiedenis Nederland



Figuur 2. J.G. Kapsenberg, medisch viroloog
Bron: Trefpunt Medische Geschiedenis Nederland

Daarnaast ontdekten ze dat de lappen huidweefsel niet hoefden te worden fijngeknipt, maar ook ongeknipt een zeer goede viruscultuur in vitro opleverden. De runderfoetus werden verkregen bij slachterijen en konden zo nodig gedurende enkele dagen in de uterus gekoeld worden bewaard. Voor het verkrijgen van het huidweefsel werd de uterus aan de oppervlakte geschroeid en geopend. Met steriele instrumenten werd de huid afgeprepareerd (figuur 3). Het was belangrijk dat het spierweefsel intact bleef, aangezien dit door de vorming van melkzuur de virusformatie zou kunnen verstoren als dit per ongeluk in de cultuur terecht kwam. Een foetus leverde gemiddeld 30 gram huidweefsel op.[6]

Het cultuurvaccin bevatte geen bacteriën of ontstekingsproducten. Het uiterlijk van de pokpuisten die in de huidreactie op het klassieke kalverlymfvaccin ontstonden, was hetzelfde als bij het cultuurvaccin. Een nadeel in de beoordeling hiervan was dat de entingen van de beide vaccins op dezelfde arm plaatsvonden, waardoor eventuele verschillen tussen het verloop van de huidreacties moeilijker kon worden beoordeeld. Het virus in het klassieke kalverlymfvaccin was virulenter dan in

het cultuurvaccin, wat het beloop van de huidreactie op vaccinatie met het cultuurvirus kon beïnvloeden.

Het onderzoek van professor Huisman

Om deze reden startte prof. dr. Joop Huisman, later gerenommeerd afdelingshoofd Infectieziektenbestrijding van de GGD Rotterdam (figuur 4), zijn onderzoek naar de lokale en algemene reactie die ontstond na primovaccinatie tegen de pokken, waarop hij in 1959 promoveerde.

Hij vergeleek de huidreacties die ontstaan na vaccinatie met de bacterievrije pokstof vervaardigd



Figuur 3. Afprepareren van huidweefsel van een runderfoetus voor het kweken van vacciniavirus
Bron: Afbeelding afkomstig uit publicatie van H.S. Frenkel en J.G. Kapsenberg, NTvG 1954 [6], via Trefpunt Medische Geschiedenis Nederland

volgens de methode van Frenkel en Kapsenberg, met de toentertijd beschikbare kalverlymfevaccins afkomstig van de Rotterdamse koepokinrichting en het Rijksinstituut voor de Volksgezondheid. De onderzoekspopulatie bestond uit mannen die in militaire dienst gingen en hun eerste training hadden voltooid. De vaccinatiegraad van de militairen was reeds verbeterd sinds de invoering van de Inentingswet van 1939; daarvoor bleek 85 procent van de militairen geboren tussen 1928 en 1940 niet te zijn gevaccineerd. Vanaf 1953 werd het militairen in Nederland verplicht zich te laten vaccineren tegen de pokken (Wet Immunisatie Militairen 1953), mits er geen contra-indicaties bestonden.[2]

Voor het onderzoek van professor Huisman werden de militairen in volgorde van aantreden om en om gevaccineerd met respectievelijk het kalverlymfevaccin (verkregen bij de Rotterdamse koepokinrichting) of het Frenkelvaccin. In totaal werden 132 militairen, in leeftijd variërend tussen de 20 en 26 jaar, gevaccineerd, van wie 63 het Frenkelvaccin en 69 het kalverlymfevaccin kregen. Er werd gevaccineerd volgens de scarificatiemethode. Na vaccinatie werden geen reconvalescente vaccinia-gammaglobulines toegediend. Dit werd rond 1959 sinds enige tijd op grote schaal toegepast in het Nederlandse leger ter profylaxe voor postvaccinale encefalitis, maar was ten tijde van het onderzoek nog niet in voldoende hoeveelheid aanwezig. Na vaccinatie werd gedurende 16 dagen dagelijks de lokale huidreactie en de algemene reactie geobserveerd en gedocumenteerd.

De ontwikkelende laesies bestaande uit onder andere erytheem, vesikelvorming, korstvorming, nevenpokvorming en kraslengte werden overgetrokken op cellofaanpapier. Degenen die klachten van algehele malaise ondervonden bleven in bed en bij hen werd de temperatuur gecontroleerd. Indien ze koortsvrij bleken en geen uitgesproken klachten hadden, werden ze geacht een lichte dienst mee te draaien. Ondanks dat het in kaart brengen



Figuur 4.
Prof. dr. J. Huisman,
sociaal-genees-
kundige
Bron: Trefpunt
Medische
Geschiedenis
Nederland

van de beschermingsduur tegen pokken na vaccinatie buiten de scope van het onderzoek lag, werd van zeven personen in iedere groep een bloedmonster verkregen, vóór en 15 dagen na de vaccinatie, om het neutraliserend vermogen van de serumparen ten opzichte van het vacciniavirus te bepalen. Hoewel er tussen beide groepen geen verschil in serologische reactie werd geconstateerd, bleken de serologische resultaten niet representatief, doordat het aantal vrijwilligers laag was en de gevolgde titratietechniek niet nauwkeurig genoeg. Daarnaast was het om praktische redenen niet mogelijk de betrokkenen na bijvoorbeeld een of twee jaar te revaccineren en serumparen te onderzoeken, wat met name voor het Frenkelvaccin wel bruikbare informatie over de duur van de sero-immuniteit had kunnen opleveren.

De lokale reacties ontwikkelden zich in beide groepen min of meer hetzelfde. Eventuele verschillen tussen de beide groepen werden toegewezen aan virusstam- en titerverschillen. Het gebruikte Rotterdamse kalverlymfevaccin gaf, bij degenen die ziek in bed bleven, significant minder hoofd- en nekpijnlachten.

Het tweede onderzoek in het proefschrift richtte zich op de klinische verschijnselen na primovaccinatie

bij twee groepen militairen, van wie er 100 met het Frenkelvaccin werden gevaccineerd en 102 met het kalverlymftevaccin (ten tijde van dit onderzoek was het vaccin alleen nog te verkrijgen via het Rijksinstituut voor Volksgezondheid). Er werden 94 personen gerevaccineerd; 44 met het Frenkelvaccin en 50 met het kalverlymftevaccin. Deze personen waren in het verleden een of meer keren gevaccineerd. Dagelijks werd de gevaccineerden een reeks vragen gesteld over het voorkomen van klachten zoals pijnklachten in de gevaccineerde arm en andere lichaamsdelen, misselijkheid en maagklachten. Daarnaast werd de huidreactie dagelijks gecontroleerd en werd er gekeken naar de aanwezigheid van lymfadenopathie. De onderzoekers waren geblindeerd voor het vaccin dat de te onderzoeken persoon had gekregen.

De klinische reactie bleek min of meer op dezelfde wijze te verlopen in beide groepen. De verschillen tussen beide groepen waren niet significant en werden tevens toegewezen aan stam- en titerverschillen van de beide vaccins. Hoofdpijn was de belangrijkste klacht die optrad na primovaccinatie. Negentig procent van gevaccineerden klaagde over hoofdpijn.

Na revaccinatie werd veelal een 'versnelde reactie' gezien. Hierbij werd het huidreactieproces dat na primovaccinatie optreedt versneld doorlopen. Naarmate de primovaccinatie langer geleden was, verschoof het reactietype echter meer naar een beeld dat werd gezien na primovaccinatie.

Bij het vergelijken van de Frenkel- en de kalverlymftegroep bij revaccinatie bleek in de kalverlymftegroep een groter aantal personen (75 procent) een versnelde reactie te doorlopen dan in de Frenkelgroep (41 procent) wanneer de persoon langer dan tien jaar geleden was gevaccineerd. Bij anderen treedt een immuniteitsreactie op. Deze reactie kent een langzamer beloop met het ontstaan van papels, die na twee tot drie dagen het hoogtepunt bereikt en waarvan de resten na vijf tot acht dagen nog zichtbaar zijn. Van belang is te benadrukken dat deze reactie een allergische

reactie is (onbekend welk type), aangezien deze met dode pokstof tevens opwekbaar is. Een goed geïmmuniseerd persoon reageert op revaccinatie met een immuniteitsreactie.

Bij 13 personen (59 procent) uit de Frenkelgroep die langer dan tien jaar geleden waren gevaccineerd en bij zeven (30 procent) uit de kalverlymftegroep trad een immuunreactie op. Deze verschillen waren echter niet significant.

Concluderend kan worden gesteld dat er slechts kleine verschillen tussen de reactiepatronen van beide vaccinatietypen bestonden. Van belang bij een dergelijk cultuurvaccin is het immunogene vermogen op langere termijn. Volgens de onderzoeken in 1958 leek dit niet samen te hangen met de titer van het vaccin, maar was er hoogstens een vertraging in de vaccinatiereactie. Een goed inzicht in de immunogene eigenschappen van het vaccin kon op dat moment echter nog niet worden verkregen. Voordelen van het Frenkelvaccin ten opzichte van het kalverlymftevaccin die toentertijd reden waren om te pleiten voor het verlaten van pokstofwinning op kalveren ten gunste van cultuurvaccins, waren dat deze kweken mogelijk waren in een laboratorium, er sprake was van een constant kweekmilieu, er geen invloed was van het gastheerorganisme, er geen specifieke eiwitstoffen en andere producten als verontreiniging in het vaccin waren, het primair steriel was en er sprake was van een goedelyofiliseerbaarheid. Daarnaast bleek de methode economisch aantrekkelijk en kon een aanzienlijk aantal kalveren een pijnlijke ziekte worden bespaard.

Het einde van de pokken en de ontwikkeling van nieuwe vaccins

Langzaam verschoof de vaccinatieproductie van het domein van de boerderijen en individuele artsen naar dat van de industrie en verving het cultuurvaccin in de jaren 80 steeds meer het klassieke kalverlymftevaccin.[8,9]

In 1967 startte de World Health Organization (WHO) een bestrijdingsprogramma om de ziekte wereldwijd

uit te roeien. Zij baseerden zich op vroege opsporing en ringvaccinatie.[9] In 1974 werd in Nederland de vaccinatie van zuigelingen afgeschaft. Het vaccinatieprogramma van militairen en reizigers naar endemische gebieden heeft nog wel enkele jaren plaatsgevonden. In 1980 werd de wereld pokkenvrij verklaard en werd het vaccineren wereldwijd gestaakt.

Dit betekende uiteraard niet dat pokkenvaccins volledig verdwenen. Verschillende voorraden bevatten nog exemplaren van het eerstegeneratie (kalverlymfe)vaccin en het tweedegeneratie (cultuur)vaccin, [9,10] maar voor het aanvullen van de gelimiteerde en sterk verouderde voorraden en om stand-by te staan voor een eventuele (bioterroristisch geïnduceerde) uitbraak, werd het noodzakelijk nieuwe, derdegeneratievaccins te produceren. Bij het derdegeneratiepokkenvaccin wordt gebruik gemaakt van levend verzwakte virussen die niet kunnen repliceren, zodat de bijwerkingen als gevolg van vaccivirusrepletie en -transmissie niet optreden.[9] Doordat de ontwikkeling van dergelijke verzwakte vaccins tijd en onderzoek vereist, publiceerden Richard Greenberg en collega's in 2005 een geblindeerd, gerandomiseerd, gecontroleerd onderzoek in *The Lancet*, waarin het geregistreerde kalverlymfevaccin werd vergeleken met het geregistreerde tweedegeneratiecultuurvaccin bij reeds gevaccineerde proefpersonen en vaccinia-naïeve personen. Naast de lichamelijke reactie op het vaccin en eventuele bijwerkingen werd ook naar neutraliserende antistoftiters en celgemedieerde immuniteit gekeken. De resultaten lieten zien dat het cultuurvaccin in beide groepen even immunogeen en veilig was vergeleken met het kalverlymfevaccin.[10]

Ondanks de beschikbaarheid van bewezen effectieve vaccins blijft men zich inspannen om nieuwe vaccins tegen de pokken te ontwikkelen. De nieuwere generatie vaccins die in ontwikkeling zijn, hebben over het algemeen naar verwachting minder bijwerkingen en zijn veiliger voor de meeste

groepen, waaronder ook immuungecompromitteerden, dan de voorgaande eerste- en tweedegeneratievaccins. Bij afwezigheid van circulatie van het pokkenvirus bij de mens zal de evaluatie van de werkzaamheid van de vaccins echter voornamelijk moeten berusten op de onderzoeksgegevens uit diermodellen.[11]

Dankwoord

Graag bedank ik M.J. van Lieburg, emeritus hoogleraar Medische Geschiedenis, voor zijn waardevolle opmerkingen en de treffende foto's van de beschreven personen.

Referenties

1. Riedel S. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*. 2005;18:21-5.
2. Huisman J. De locale en algemene reactie na primovaccinatie tegen pokken. Een vergelijking van de klassieke kalverlymfe met het cultuurvaccin volgens Frenkel, toegepast bij adolescenten en jonge volwassenen. Leiden: Rijksuniversiteit te Leiden; 1959.
3. Brown T. The African Connection. Cotton Mather and the Boston Smallpox Epidemic of 1721-1722. *JAMA*. 1988;260:2247-9.
4. Boylston A. Daniel Sutton, a forgotten 18th century clinician scientist. *J R Soc Med*. 2012;105:85-7.
5. W. Rutten. De vreselijkste aller harpijen. Pokkenepidemieën en pokkenbestrijding in Nederland in de 18e en 19e eeuw. Wageningen: Landbouwwuniversiteit te Wageningen; 1997.
6. Frenkel H, Kapsenberg J. Het kweken van vaccinia-virus in geëxplanteerd huidweefsel van runder- en schapenfoetus. *Ned Tijdschr Geneesk*. 1954;98:991-6.
7. Ruys A. Berichten en mededeelingen. Entingen met neurovaccine onder de huid. *Ned Tijdschr Geneesk*. 1934;78:3817-8.
8. Artenstein A. *Vaccines: A Biography*. 2010th edition ed.: Springer; 2010. Chapter 2 Smallpox. p. 9-29.
9. RIVM. LCI-richtlijn Pokken. Available at: <https://lci.rivm.nl/richtlijnen/pokken>. Accessed 2020-10-07, 2020.
10. Greenberg RN, Kennedy JS, Clanton DJ, et al. Safety and immunogenicity of new cell-cultured smallpox vaccine compared with calf-lymph derived vaccine: a blind, single-centre, randomised controlled trial. *Lancet*. 2005;365:398-409.
11. Meseda CA, Weir JP. Third-generation smallpox vaccines: challenges in the absence of clinical smallpox. *Future Microbiol*. 2010;5:1367-82.