

Studijní materiál – speciál č. **122**

Květen 2011

Věnováno památce MUDr. Witolda Gawlase

Pokroky ve vývoji vakcín proti *Neisseria meningitidis* (Advances in the Development of Vaccines against *Neisseria meningitidis*)

Tan Lionel K.K., Carlone Georgie M., Borrow Ray,
N Engl J Med 362; č.16, April 22, 2010, s. 1511-1519
Volně přeložil a zkrátil MUDr. Vladimír Plesník

Byť již uplynuly dvě století od Vieusseuxova popisu meningokokové epidemie stále zůstává *Neisseria meningitidis* nejčastějším původcem sepsí a meningitíd. Fulminantní meningokokové onemocnění se může rychle rozvinout a bývá provázeno letalitou přesahující 20 %. Proto snahy o kontrolu nemoci se soustředily na očkování. Dřívější vakcíny proti meningokokům byly u kojenců, kteří jsou nejvíce ohroženi, málo imunogenní a nenavozovaly dlouho trvající imunitu. Ačkoli současné vakcíny zlepšily ochranu kojenců pořád chybí účinná vakcína proti skupině B *Neisseria meningitidis* (NMB). Ta nyní převládá v průmyslových státech mezi kmeny meningokoků od pacientů.

V posledních deseti letech však výsledky výzkumu obnovily naděje na vyřešení tohoto velkého problému. Poznání genomu meningokoků vedlo ke zjištění nových antigenů, které byly začleněny do vakcín proti NMB, nyní testovaných v klinických studiích. Dosud je však stále nejisté, zda tyto vakcíny budou u kojenců dostatečně imunogenní a zda zajistí širokou ochranu před NMB. Tento přehled zachycuje vývoj všech meningokokových vakcín a probírá strategie, které bude nutné užít k překonání potíží při vývoji vakcín proti NMB.

Epidemiologie infekcí *N. meningitidis*

Nemoci vyvolávané meningokoky jsou problémem na celém světě. Podle odhadů Světové zdravotnické organizace (SZO) ročně vzniká 1,2 milionu případů invazivních meningokokových onemocnění se 135 000 úmrtími. Zatím co v průmyslových státech jsou tato onemocnění sporadická, např. jejich incidence v USA činí 0,35 případu na 100.000 obyvatel a v Evropě 1,01 / 100.000, (ale kolísá od 0,25 do 4,4 / 100.000 v Itálii nebo na Maltě), největší škody na zdraví a životě působí v rozvojových státech. Při nedávné epidemii v Nigérii došlo během jediného týdne ke 4164 onemocněním a 171 úmrtím.

Meningokok je pouze lidským patogenem. Až u 40 % dospělých osob asymptomaticky kolonizuje nosohltan, někdy však vyvolá invazivní onemocnění. Meningokoky vyvolávající invazivní infekce lze řadit podle jejich polysacharidového pouzdra do šesti skupin (A, B, C, W-135, X a Y). Výskyt onemocnění podle těchto skupin je odlišný : Skupina A je odpovědná za velké

epidemie v Africe, při nichž incidence dosahuje hodnot až 1000 na 100.000 obyvatel (mohou se uplatňovat faktory životního prostředí), zatím co skupiny B a C jsou původci onemocnění hlavně v průmyslových státech. V poslední době se jako významné patogeny jeví skupiny W-135 a X (hlavně v Africe) a skupina Y v USA a dalších zemích.

Ochrana hostitele před *N. meningitidis*

Ochrana před meningokokovou infekcí závisí na vrozené imunitě, především na správné funkci komplementového systému. Chybění některých složek systému, nebo změny regulátorů komplementového systému, jsou příčinou vyšší vnímavosti k nákaze. Důležitá je tvorba a přítomnost protilátek vůči *Nm*. Testy baktericidních protilátek v séru slouží k hodnocení likvidace *Nm* specifickými protilátkami, které se vážou na meningokoka a aktivují komplementový systém. Od 60. let minulého století, kdy bylo zjištěno, že osoby mající tyto protilátky v titru 1:4 a vyšším jsou (za přítomnosti lidského komplementu proti skupině C) chráněny před onemocněním, stalo se stanovení baktericidních protilátek v séru standardním imunologickým ukazatelem ochrany. I když se uvádí, že nejvyšší incidence nemoci je u kojenců ve věku 6-24 měsíce, majících nejnižší titry sérových baktericidních protilátek (SBP), nové poznatky z USA ukazují, že v současnosti je nejvyšší incidence u kojenců mladších šesti měsíců, kteří mají nejnižší titry těchto protilátek, protože nejsou chráněni specifickými SBP proti meningokokům od matky.

Role komplementu

Polysacharidové pouzdro, obsahující, s výjimkou skupiny A, u všech invazivních skupin meningokoků kyselinu sialovou, poskytuje mikrobu ochranu před komplementem zprostředkovaným usmrcením, před opsonizací a fagocytózou. Na patogenezě se podílejí také lipo-oligosacharid meningokoků a proteiny zevní membrány. Při invazivní infekci mikrob uvolňuje do krevního oběhu proteiny zevní blány a vesikly této blány obsahující lipo-oligosacharid, které mohou ovlivnit imunitní reakci. Meningokok také specificky reaguje s regulátory komplementu. Například mikrob se přes lipoprotein zevní membrány váže na negativní regulační H faktor komplementu. Tento protein obsahují dvě v současnosti testované vakcíny. Může se vázat na další regulátor komplementu, prostřednictvím PorA na C4BP, což je imunogenní protein zevní membrány.

Vývoj vakcín proti *N. meningitidis*

Kapsulární polysacharidové vakcíny

V 60. letech 20. století byly vyvinuty první účinné vakcíny proti skupinám A a C, založené na jejich kapsulárním polysacharidu.. Později se dostaly do oběhu polysacharidové vakcíny proti skupinám W-135 a Y. Od roku 1981 je v USA schválena kvadrivalentní meningokoková vakcína proti skupinám A, C, W-135

a Y. Před udělením licence byla prokázána její bezpečnost a imunogenost. Účinnost u mladistvých a dospělých proti skupinám A a C měla větší než 85 %. Avšak s výjimkou polysacharidu skupiny A neposkytují tyto vakcíny solidní ochranu očkovancům mladším dvou let. Polysacharidy jsou také antigeny nezávislé na T buňkách, což vede ke vzniku jen krátkodobé ochrany bez imunitní paměti. Podání vakcín je nutné opakovat každé 3-5 roky, ale protilátková odpověď může být následkem menšího počtu paměťových B buněk slabší, než jaká byla po podání první dávky.

Konjugované vakcíny

K dosažení delšího trvání postvakcinační ochrany se začaly užívat vakcíny, u nichž jsou polysacharidy vázány (konjugovány) na proteinový nosič. Tak je vyvolána imunita zprostředkovaná T-buňkami a vznik imunitní paměti. Anglie byla roku 1999 první zemí, která zařadila do schématu rutinního očkování kojenců konjugovanou vakcínu obsahující polysacharid meningokoků skupiny C vázaný na protein - MenC. Současně bylo možné výběrové očkování dětí a mladistvých ve věku do 18 let. Po zahájení aplikace této vakcíny došlo k výraznému poklesu nosičství meningokoků skupiny C a jimi vyvolávaných onemocnění. Vakcína MenC zajišťuje signifikantní kolektivní imunitu, vedoucí k poklesu výskytu této infekce i mezi neočkovanými osobami. Je to následek méně častého nosičství mezi mladistvými, kteří jsou hlavními přenašeči meningokoků.

Vakcína MenC je bezpečná. Surveillance v prvním roce po očkování svědčí o 95% účinnosti ve všech věkových skupinách, ta však během čtyř let významně klesá. I když ve vybrané sledované skupině kojenců, očkovaných ve 2., 3. a 4. měsíci života, byl 95% efekt očkování, u stejně starých a očkovaných dětí mimo studii byla celková účinnost jen 66%. Po dobu jednoho roku byl efekt očkování u kojenců vybrané skupiny 93%, ale později nebyla již ochrana prokazatelná. K invazi meningokoků do organismu může dojít během několika hodin, takže imunitní paměť navozená konjugovanými vakcínami se včas neuplatní. Naopak k ochraně jsou třeba baktericidní protilátky v krvi, ty však po očkování v kojeneckém věku nepřetrvávají. Je to asi důsledek krátkého přežívání plasmatických buněk. Aby byla zachována ochranná hladina protilátek pozměnili v Anglii schéma očkování vakcínou MenC tak, že po její aplikaci ve 3. a 4. měsíci života podávají ve 12. měsíci ještě posilující dávku vakcíny. Také další státy v Evropě, Kanada a Austrálie zařadily MenC do schématu rutinního očkování.

Zatím, s ohledem na poměrně vysokou incidenci onemocnění vyvolávaných meningokoky skupiny Y (37 % ze všech meningokokových onemocnění za léta 1997-2002), licencovali v USA kvadrivalentní vakcínu (A, C, W135 a Y) konjugovanou na difterický toxoid k imunizaci osob ve věku 2 - 55 let. I když je tato vakcína doporučována osobám ve věku 11 - 18 let, její imunogenita je u kojenců - nejohroženější skupiny populace - špatná. Jsou však testovány další

multivalentní vakcíny i pro kojence, včetně vakcíny MENVEO (Novartis), obsahující polysacharidy skupin A, C, W-135 a Y, vázané na mutantu difterického anatoxinu. Tato navozovala dobrou protilátkovou ochranu u všech věkových skupin a bude asi licencována pro osoby ve věku 11 – 55 let, protože její schválení pro kojence a děti závisí na výsledku dosud probíhajících studií. Probíhá také klinické testování kombinované vakcíny proti *Haemophilus influenzae* typu B a meningokokům skupin C a Y, vázané na tetanický anatoxin.

S ohledem na úspěch vakcíny MenC začaly se konjugované vakcíny užívat při nejtěžších epidemiích vyvolávaných v Africe meningokoky skupiny A, kde byly dosud k dispozici jen polysacharidové vakcíny. Projekt přípravy vakcín proti meningokokům („Meningitis Vaccine Project“) vedl k vývoji použitelných konjugovaných vakcín proti meningokokům skupiny A. Vakcína MenAfriVac (Serum Institute of India) se ve 2. a 3. kole studií v Africe a v Indii ukázala jako bezpečná a imunogenní. Probíhají ještě klinické studie, které ověří, zda vakcína vyvolá dlouhodobou ochranu kojenců. Mezitím byla zahájena náročná kampaň, při níž má být v letech 2010-2015 očkováno touto vakcínou 250 milionů osob ve 25 afrických státech. Je zde však určité riziko : aplikace monovalentní vakcíny proti skupině A nevyvolá ochranu před séro skupinami W-135 a X, které se v Africe nyní prosazují.

Vývoj vakcíny proti *Neisseria meningitidis* séro skupiny B

Po poklesu výskytu infekcí NMC, po vývoji multivalentních konjugovaných vakcín pro kojence a při očekávaného úspěchu vakcinace MenAfriVac v Africe jsou dnes velkým problémem infekce vyvolávané *Ns* skupiny B (NMB). Vývoj vakcín proti NMB brzdí pouzdro séro skupiny B, složené z α 2-8-vázané kyseliny polysialové a jeho struktura, která je shodná s vazebními molekulami fetálních mozkových buněk. Pro imunotoleranci je pouzdro NMB málo imunogenní. Pokusy o vyvolání zkřížených imunitních reakcí proti polysacharidu pouzdra NMB vedly k vývoji vakcíny, u níž byla *N*-acetylová skupina polysialové kyseliny nahrazena *N*-propionylovou skupinou a polysacharid byl vázán na tetanický anatoxin. Ač byla tato vakcína u 17 zdravých dospělých dobrovolníků bezpečná a imunogenní, ve vzorcích séra odebraných po očkování nebyla zjištěna baktericidní, ani jiná ochranná aktivita. Je také obava, že podle některých výsledků laboratorních testů může podání polysacharidových vakcín proti NMB navodit u očkových tvorbu protilátek proti vazebním molekulám nervových buněk. Během nedlouhého sledování těchto očkových osob však nebyl vznik takových protilátek prokázán. Ani během 31letého sledování pacientů s infekcí NMB nebylo zjištěno riziko autoimunních onemocnění větší, než u celé populace. Přesto obava z případného vzniku autoimunity vede k vývoji vakcíny založené na nekapsulárních strukturách zevní membrány NMB.

Vakcíny obsahující vesikuly zevní membrány NMB

Váčky (vesikuly) zevní blány obsahují směs imunopotentních antigenů, včetně lipo-oligosacharidu a bílkovin zevní membrány. Lze je získat z vykultivovaných meningokoků. Lipo-oligosacharid (známý také jako endotoxin) je potenciálně toxická látka, kterou lze pomocí detergentů, při zachování základních bílkovin zevního obalu, extrahovat z váček zevní blány. Stal se podstatou některých vakcín proti NMB, užitých s proměnlivým úspěchem v klinických studiích, které se v 80. a 90. letech 20. století uskutečnily v Čile, Kubě, Brazílii a v Norsku. Například kubánská vakcína připravená z obsahu váček epidemického kmene NMB, byla podle studií na Kubě účinná, ale nápadně lepší výsledky byly s ní získány při studiích v Brazílii. V novější době vakcína MeNZB, vyvinutá na principu váček Norským ústavem veřejného zdraví a firmou Novartis, se osvědčila při kontrole epidemie na Novém Zélandu.

Tyto „vesikulární“ vakcíny vyvolávají hlavně kmenově specifickou imunitu proti proteinu PorA, který je však mezi kmeny NMB velmi proměnlivý. Ač jsou v epidemiích, vyvolávaných kmenem NMB exprimujícím jediný typ PorA, účinné, neuplatní se proti infekcím působeným NMB s jinými typy široké škály PorA, které cirkulují spolu s epidemickým kmenem. Na příklad k ochraně před 80 % kmenů NMB, které jsou v USA původci endemických onemocnění, by bylo třeba mít vakcínu se 20 různými typy proteinu PorA. Je zřejmé, že by při takové variabilitě PorA byly vesikulární vakcíny v řadě států nepraktické. Není ani jasné, jak dlouho by přetrvala ochrana po imunizaci. Při očkovací kampani na Novém Zélandu bylo třeba aplikovat kojencům čtyři dávky MeNZB.

Možným řešením omezené účinnosti vesikulárních vakcín, připravených z obsahu PorA v jednom váčku, je výroba vakcín z obsahu dvou a více váček, které obsahují řadu typů proteinů PorA. Takto byla připravena hexavalentní vakcína (HexaMen, Nizozemský institut vakcín). Ve studiích druhé fáze testování byla u kojenců prokázána její bezpečnost a imunogennost, k vyvolání zkříženě reagující imunity však bylo nutné ve věku 12 – 14 měsíců aplikovat 4. dávku vakcíny. Vakcína NonaMen (Nizozemský institut vakcín), vyrobená přidáním obsahu třetího váčku NMB, prochází v současnosti preklinickými zkouškami.

Americký výzkumný ústav (Walter Reed Army Institute of Research) vyvinul multivalentní vesikulární vakcínu z nativních (na rozdíl od detergenty extrahovaných antigenů) váček tří kmenů, geneticky modifikovaných tak, aby exprimovaly odlišné vesikuly. V první fázi pokusů byla tato vakcína bezpečná a u dospělých účinná proti širokému spektru kmenů NMB. Možná potíž vesikulárních vakcín však spočívá v tom, že proteiny zevního obalu meningokoků podléhají antigennímu posunu nebo ztrátě genu, což by vedlo k neúčinnosti vakcíny.

Reverzní postup při vývoji vakcín a rMenB

Potřeba najít co nejméně variabilní antigeny pro vývoj univerzální vakcíny proti NMB si vynutila hledání alternativních postupů jejich vývoje. Reverzní

postup přípravy vakcíny (*reverse vaccinology*) byl nazván podle toho, že jeho začátek je založen na výběru vhodných antigenů pomocí počítačového programu. Ten nahrazuje zdlouhavé konvenční postupy spojené s kultivací živých mikrobů. Většina antigenů, obsažených v současných vakcínách, tedy kapsulární polysacharid nebo modifikované toxiny, se podílí na patogenitě. Při reverzním postupu jde o náhodný výběr složek genomu pro vakcínu, včetně těch, které jsou obvyklými metodami těžko postižitelné. Je zajímavé, že adhesin A *N.meningitidis* (NadA) a faktor H vázající protein (fHbp), které se také uplatňují na patogenitě meningokoků, byly identifikovány reverzním postupem přípravy vakcíny. Postup byl poprvé popsán roku 2000 a posloužil k identifikaci 350 genů v genomu *N.meningitidis*, které kódují pravděpodobné antigeny proteinů na povrchu mikroba. Byla testována jejich schopnost vyvolat tvorbu baktericidních protilátek. Pět nejnadějnějších antigenů, odvozených z genomu meningokoků (GNAs), bylo užito k přípravě vakcíny s názvem rMenB (Novartis). Jsou to : *N.meningitidis* adhesin A (NadA, nebo GNA1994), factor H-binding protein (GNA1870, GNA2091, GNA2132 - fHBP - nově přejmenovaný na „neisserial heparin-binding antigen) a GNA1030. V séru myši očkované touto vakcínou našli baktericidní protilátky proti 78 % vybraných kmenů NMB.

Úloha dvou antigenů obsažených ve vakcíně na patogenezi meningokoků

Zařazení dvou antigenů (NadA a factor H-binding protein) do vakcíny rMenB ukázalo jak se podílí na patogenezi meningokoků. NadA je povrchový protein přítomný jen u 50 % kmenů meningokoků, které byly izolovány od pacientů s meningokokovým onemocněním, a u 5 % kmenů zachycených u nosičů meningokoků. Uplatňuje se při kolonizaci sliznice a při pronikání do buňky. Hypervirulentní kmen meningokoka měl po inaktivaci NadA genu menší schopnost vnikat do buněk lidského epitelu. Následkem interakce s makrofágy a s monocyty se NadA uplatňuje také při pronikání meningokoků do tkání a krevního oběhu.

Jak bylo výše uvedeno proteinový faktor H se váže na regulační faktor H komplementu a potlačuje tak komplementem podmíněnou odolnost. Hypervirulentní kmeny produkují velké množství tohoto faktoru, což objasňuje jeho úlohu v patogenezi.

Proteinový faktor H, vakcinální antigen odvozený z genomu, i PorA, vakcinální antigen z vesikul zevní membrány, interagují s regulátory komplementu (PorA za nefyziologických podmínek). Využití těchto antigenů k přípravě vakcíny může být výhodné, protože nejen navodí tvorbu baktericidních protilátek, ale mohou také vyvolat tvorbu protilátek, které zablokují vazbu regulátorů komplementu na povrch bakterií, čímž bude podpořena jejich komplementem zprostředkovaná likvidace. Zjištění dalších bakteriálních složek, reagujících s komplementem, může odhalit další možné součásti nových vakcín.

Současné klinické studie a výhled do budoucna

Roku 2008 zahájila firma Novartis Vaccines u dospělých i u kojenců klinické studie s vakcínou rMenB, a to jak s, tak bez složek vesikul zevní membrány kmene novozélandské vakcíny. Ve 2. fázi studie bylo ve věku 2, 4 a 6 měsíců očkováno 150 kojenců. Jak bezpečnost, tak imunopotence vakcíny byla uspokojivá. Baktericidní protilátky v séru proti třem referenčním kmenům NMB v titru 1:4 a vyšším mělo po 3. dávce 89 %, 96 % a 85 % očkovaných. Po posilující dávce vakcíny, aplikované ve 12. měsíci věku, dosáhlo těchto hladin 100 %, 98 % a 93 % očkovaných. Zařazení vesikul zevní membrány NMB do vakcíny rMenB vedlo díky obsahu antigenu PorA k mimořádnému rozšíření účinnosti na různé kmeny NMB. Firma Wyeth také nezávisle na Novartis identifikovala proteinový vazebný faktor H a vyvinula vakcínu, obsahující dvě varianty proteinu (rLP2086). Tato vakcína byla u 103 mladých dospělých osob v 1. fázi klinické studie bezpečná a imunopotentní. Baktericidní protilátky v séru proti pěti ze šesti referenčních kmenů NMB mělo 87,5 % účastníků studie. Séra očkovaných usmrcovala velký podíl izolovaných invazivních meningokoků.

Bezpečnost a imunogenita vakcín rMenB a rLP2086 je dále ověřována. Chystá se 2. a 3. fáze studií rMenB u kojenců, batolat (u primovakcinovaných přeočkování nebo výběrové očkování) a u mladistvých. Současně probíhá 1. a 2. fáze studií u kojenců s rLP2086 a další hodnocení u mladistvých a u dospělých. Ač se původně předpokládalo, že reverzní postupy vývoje vakcín budou méně časově náročné než konvenční postupy, ukázalo se, že ještě stále není jisté, zda vakcína rMenB vyvinutá před 10 lety bude úspěšná.

Využití faktoru H je problematické v tom, že jím navozené baktericidní protilátky specificky reagují s příslušným vazebným proteinem a že byly nalezeny invazivní kmeny meningokoků mající faktor H zkomolený. Zatím co vakcína rLP2086 obsahuje dvě varianty faktoru H, vakcína rMenB obsahuje jen jednu variantu. To sice zužuje spektrum působnosti vakcíny rMenB, ale je vyváženo obsahem dalších antigenů v ní. Alternativou je připravit chiméru proteinu s epitopy imunodominantních úseků různých variant faktoru H. Vakcíny budoucnosti mohou také obsahovat rekombinantní protein upravený tak, aby nevázal faktor H. Reverzní postup přípravy vakcín dále identifikuje potenciálně užitečné antigeny. Také genetickou modifikací detoxikované lipooligosacharidy jsou možnými kandidátními vakcínami. Úspěšný vývoj vakcíny proti NMB může nastartovat vývoj univerzální vakcíny proti všem skupinám meningokoků tím, že antigeny NMB vakcíny budou přidány k antigenům jiných skupin meningokoků.

Z Á V Ě R Y

Pro devastující následky je stále meningokoková infekce hrozbou celému světu. Ač se ukázalo, že konjugované vakcíny jsou účinné i bezpečné, není jasné, zda nedávný pokrok ve vývoji vakcín povede v dohledné době k přípravě

univerzální vakcíny proti NMB. Zůstává několik problémů : Zprvé musíme zvýšit imunogenitu meningokokových vakcín u kojenců. Tato věková skupina je meningokokovými infekcemi nejvíce ohrožena. Platí to zvláště v USA, kde je menší proočkovanosť vakcínou MenC, i když tu mají licencované multivalentní konjugované vakcíny, které však nezajišťují ochranu kojenců. Zadruhé musíme ověřit, že variabilita nově zjištěných antigenů neomezí v budoucnu účinnost vakcín. A konečně musíme vybrat vakcíny, které navodí kolektivní imunitu a povedou ke stejně dramatickému snížení nemocnosti, jaké vzniklo po široké aplikaci vakcíny MenC. Teprve pak bude možné vyvinout širokospektrou vakcínu proti skupině B *Neisseria meningitidis*, což je dnes ještě nemožné.

58 citací, kopie u překladatele

Poznámka překladatele:

Další nové informace o vakcinaci proti meningokokům budou v SMS 123. Nyní dávám přednost aktuálním, byť hodně smutným zprávám :

MUDr. Witold Gawlas

24. 6. 1931 – 9. 4. 2011

Byl jedním z prvních absolventů LFH UK Praha, kteří v roce 1956 přišli na KHES Severomoravského kraje posílit a zkvalitnit řady pracovníků hygienické služby. Již po necelých dvou letech se stal okresním hygienikem ve Vítkově, kde však onemocněl tuberkulózou. Roku 1960 se vrátil na KHES SMK a byl dlouholetým zástupcem ředitele pro zvláštní úkoly. V únoru 1970 vyhrál konkurz na funkci vedoucího oddělení DDD. Tuto práci úspěšně vykonával až do odchodu do starobního důchodu v roce 1992.

Na rozdíl od jiných prosazoval ve vztahu ke klinickým lékařům při řešení problematiky nemocničních nákaz (NN) méně kontroly, ale více spolupráce. Po vyčlenění dezinfekce a deratizace z pracovní náplně řídil moderní Oddělení nosokomiálních nákaz a dezinfekce (NND) mající tři úseky- terénní, bakteriologický a chemický, na němž pracoval jeden lékař, 3 vysokoškoláci, 4 AHS a 4 ZL.

Vynikal zvláště ve svízelných dobách epidemií, nebo nedostatku potřebného materiálu k dezinfekci, či chybějící laboratorní kapacity k vyšetřování příčin vzniku NN. Byl autorem různých zlepšovacích návrhů, z nichž uznání a široké využití měla například praktická kapková metoda k orientačnímu stanovení koncentrace používaného roztoku Persterilu. Nezapomenutelná je jeho vynalézavost při řešení pozdních dodávek injekčních stříkaček a jehel, nebo při hledání náhrad dezinfekčních přípravků v době jejich zoufalého nedostatku. Svou iniciativu a zkušenosti uplatnil při realizaci Mikrobiologicko - epidemiologických prověrek zdravotnických pracovišť, při čemž se zaměřil i na méně sledovaná pracoviště stomatologů, nebo na ústavní prádelny a Oddělení centrální sterilizace. Podílel se na přípravě Pokynů pro dezinfekci ve

zdravotnických zařízeních, na vypracování Komplexního programu surveillance NN, byl předsedou dočasné pracovní skupiny NN při Poradním sboru hlavního hygienika ČR. Významně se uplatnil při vzniku publikace „Dezinfekce, sterilizace a režim v prevenci nemocničních nákaz“ (Zdrav. aktuality č. 202, AVICENUM, 1982) a při připomínkování řady připravovaných metodických pokynů o NN.

Podporoval zavádění nových forem surveillance a výpočetní techniky, zejména ujasňování definic a postupů při zavádění Informačního systému přenosných onemocnění (ISPO), nebo Informačního systému imunizace dětí (ISID). Byl iniciátorem a zdrojem cenných nápadů, studnicí zkušeností, které mu zajistily odbornou reputaci v celém státě.

Ale nejen prací živ je člověk. Jeho spolupracovníci, následovníci a přátelé mají Witolda v paměti jako obětavého člověka, který měl pochopení pro radost i smutek jiných, který se ani v těžkých dobách nevzdával nadějí ve zlepšení a dokázal svým optimismem nakazit své okolí. Jeho zvučný baryton vévodil nejen v pěveckém sboru, kam léta pravidelně docházel, ale také při posezeních s kamarády. Odešel a už nám nezaspívá , jeho hlas a myšlenky však v našich vzpomínkách nezapadnou. Čest jeho památce !

