

Příhláška do interní grantové soutěže

Název projektu:

Validace výsledků konvenční analýzy kostní dřeně a pilotní fáze digitalizace cytomorfolgie kostní dřeně

Hlavní řešitel

MUDr. David Starostka, Ph.D.

Tel. 596491634, 606771972

E-mail: david.starostka@nemhav.cz

CV a přehled publikací: příloha č. 1 a 2

Členové týmu

MUDr. Richard Doležilek

Mgr. Kateřina Chasáková

Mgr. Petra Miczková

Akademický partner a spolupracující subjekty

Prof. Dr. Med. Hans Michael Kvasnicka

Institut für Pathologie und Molekularpathologie, Helios Universitätsklinikum Wuppertal

Prof. MUDr. Edgar Faber, CSc.

Hemato-onkologická klinika FN a LF UP Olomouc

Doc. Dr. Ing. Eva Kriegová

Ústav imunologie FN a LF UP Olomouc

Doc. Mgr. Miloš Kudělka, Ph.D.

Fakulta elektroniky a informatiky VŠB-TUO Ostrava

RNDr. Zbyněk Halbhuber, Ph.D.

Altium International s.r.o.

Qian Wu, Ph.D.

Hangzhou ZhiWei Information Technology, China

Doba řešení

17.7.2023 - 30.7.2024 (12 měsíců)

Úvod do problematiky:

Multidisciplinární diagnostika v hematologii

Diagnostika v hematologii má multidisciplinární charakter založený na komplementaritě a synergii analytických metod: morfologie (cytologie a histologie), imunofenotypizace (průtoková cytometrie a imunohistochemie), genetické vyšetření a zohlednění klinického obrazu nemoci. **Přesná diagnóza a detailní odlišení hematolymfoidních neoplázií má klíčový klinický význam. Biologický charakter jednotlivých entit rozhoduje o klinickém průběhu a prognóze a zásadním způsobem ovlivňuje individualizaci léčby.** Relativní důležitost diagnostických metod se liší mezi entitami a neexistuje univerzální diagnostický standard.¹ Významná je též existence a stupeň diagnostické nejistoty. Jednotlivé diagnostické entity jsou tříděny v rámci WHO klasifikace nádorů hematopoetické a lymfoidní tkáně.¹ Kostní dřev je nejčastějším orgánem vyšetřovaným v rámci hematologické diagnostiky.

U cytologie jsou nátěry kostní dřevě kolorovány panoptickým barvením Pappenheimovou metodou a vyšetřovány ve světelném mikroskopu v přiměřeně tenké oblasti nátěru s využitím imerzních nebo neimerzních objektivů různého zvětšení pro hodnocení kvality, buněčnosti, rozložení buněk nebo detailního pozorování, popisu a klasifikace. K dispozici jsou také digitální morfologické analyzátoři.^{2,3}

Histologické vyšetření se provádí světelnou mikroskopií u biotických vzorků po jejich fixaci a zpracování do tenkých tkáňových řezů z parafinových bloků v základním barvení hematoxylinem-eozinem a využívá informací o detailní mikroarchitektonice postižené tkáně.²

Průtoková cytometrie umožňuje rychlou kvalitativní a kvantitativní analýzu optických a fluorescenčních vlastností obrovského množství elementů v tekutých suspenzích. Multiparametrický charakter analýzy umožňuje simultánní stanovení řady parametrů na povrchu či uvnitř buněk s využitím fluorochromů s diferencovaným emisním spektrem a monoklonálních protilátek. Základními analyzovanými prvky jsou velikost částic (FSC), denzita jejich vnitřního obsahu (granularita, SSC) a intenzita fluorescence, tj. emise fotonů o konkrétní vlnové délce způsobená specifickou laserovou excitací.^{2,4,5,6}

Imunohistochemie představuje imunofenotypizaci v tkáňových řezech. Detekce specifických antigenů probíhá na stejném základním principu jako u průtokové cytometrie – vizualizace vazby antigenu a protilátky.^{2,7}

Cytogenetické vyšetření se nejčastěji provádí jako karyotypizace metodou G-pruhování založenou na působení trypsinu a barvení barvivem Giemsa-Romanowski, hodnocení probíhá pomocí světelného mikroskopu, standardně se hodnotí 30 mitóz.^{2,6}

Molekulárně genetické metody umožňují precizní a senzitivní identifikaci patologických genetických změn na různých principech.^{2,6,8,9}

Cytologická analýza kostní dřeně

Pro klasifikaci hematolymfoidních novotvarů a mnoha nenádorových stavů byly definovány přesné cytomorfologické znaky. Kostní dřeň (KD) má nejsložitější cytologický vzorec tvořený více než 200 typy buněk. Správné hodnocení a interpretace nátěrů periferní krve (PK) a KD je nepostradatelnou součástí multidisciplinární diagnostiky téměř 200 známých hematolymfoidních neoplazmat.^{1,2} Optická mikroskopie zůstává referenčním zlatým standardem analýzy krevních buněk. Tato profesně i časově náročná analýza vyžaduje odborné znalosti vysoce kvalifikovaných a zkušených odborníků a je spojena s variabilitou související se subjektivitou hodnocení.^{3,4}

Hodnocení nátěru aspirátu KD je součástí diagnostického vyšetřovacího postupu u pacientů s hematologickými chorobami, či u pacientů, u kterých existuje podezření (např. z nátěru PK) na hematologické onemocnění, které je nutné hodnocením aspirátu KD ověřit. Součástí hodnocení je stanovení relativního rozpočtu hematopoetických buněk (myelogram) a morfologický popis hematopoetických vývojových řad a dalších buněk přítomných v kostní dřeni.¹⁰

Mikroskopické hodnocení obarveného nátěru aspirátu KD začíná vždy přehledným zhodnocením při menším zvětšení (100–400×), a to i v okrajích a konečných cípech nátěru, kde mohou být vytlačeny větší buňky či kompaktní shluky patologických buněk. Pak následuje vlastní hodnocení při zvětšení 1000×. Vyšetření provádí garant výkonu (lékař se specializovanou odbornou způsobilostí v oboru Hematologie a transfúzní lékařství), který je zodpovědným pracovníkem ke konečnému uvolnění výsledku tohoto vyšetření pro klinické lékaře a který je schopen uvést interpretaci s event. klinickou rozvahou. Ta by měla být součástí výsledku. Na hodnocení vyšetření se mohou podílet i oprávnění pracovníci (laborant, VŠ nelékař).¹⁰

Zvětšení 100–400× je určeno pro zhodnocení:

- a) kvality nátěru a kvality jeho obarvení
- b) buněčnosti nátěru
- c) přítomnosti a morfologie megakaryocytů
- d) orientačního zastoupení jednotlivých vývojových řad včetně jejich nerovnoměrné distribuce
- e) přítomnosti ostrůvků erytropoezy
- f) přítomnosti velkých fyziologických i patologických buněk, případně jejich trsů zejména v okrajích či konečných cípech nátěrů
- g) přítomnosti ojedinělých patologických buněk u těžce hypocelulárních nátěrů
- h) výběru těch úseků preparátu, kde jsou buňky náležitě rozprostřeny a jsou vhodné pro hodnocení při větším zvětšení.

Při zvětšení 1000x popisujeme jednotlivé buňky (morfologický popis) a počítáme jejich zastoupení (myelogram). K hodnocení si vybíráme část nátěru, ve které jsou buňky rovnoměrně rozprostřeny. U vstupního vyšetření aspirátu KD se doporučuje spočítat 500 jaderných buněk; u kontrolních či hypocelulárních nátěrů pak alespoň 250–300 jaderných buněk. V případech, kdy není splnění tohoto početního zastoupení možné či účelné, je nutný komentář v popisu. Nátěr v mikroskopu hodnotíme meandrovitým či bajonetovým rovnoměrným pohybem objektivu nad podložním sklem nejlépe na šířku skla od jednoho okraje k druhému.¹⁰

Myelogram odpovídá poměrnému zastoupení jaderných buněk v kostní dřeni, které je vyjádřeno v procentech. Přítomnost buněk, které se do běžného rozpočtu nezařazují, se udává v poměrném zastoupení (tj. např. N/100, N/250, N/300, resp. N/500). Do myelogramu započítáváme granulopoézu, erytropoézu, lymfocytopenoézu, monocytopenoézu, mastocyty a další definované buňky. Morfologicky popisujeme každou vývojovou řadu zvlášť – její početní a poměrné zastoupení, přítomnost jednotlivých stádií, jejich morfologické změny.¹⁰

Histologická a imunohistochemická analýza KD

Hodnocení trepanobiopsie (biopsie KD) patří mezi nejsložitější vyšetření v patologii, která provádí atestovaný patolog (lékař se specializovanou způsobilostí v oboru patologie), který se vedle všech orgánových systémů věnuje hlouběji i hematopatologii, což jsou biopsie nejen z lymfatických uzlin a KD, ale ze všech orgánových systémů, které jsou postiženy nějakým lymfoproliferativním procesem. Práce hematologa začíná ještě před zhodnocením vlastní biopsie, a to prostudováním veškeré dostupné dokumentace k pacientovi. Různé klinické stavy totiž v kostní dřeni vytvářejí takové morfologické projevy, které bez znalosti klinických informací mohou imitovat nádorový proces, ačkoli se jedná o prosté reaktivní změny.^{11,12,13}

Hodnocení trepanobioptického vzorku je komplementární vyšetřovací metodou k hodnocení krevního obrazu, diferenciálního rozpočtu leukocytů, k cytologickému hodnocení aspirátu KD, průtokové cytometrii a cytogenetickému vyšetření. Ke každé trepanobiopsii je vyhotoveno vedle základního barvení hematoxylin-eosin i několik barvení speciálních a to PAS, Giemsa, retikulín (Gömori), modrý trichrom, Van Gieson a Perlsova reakce na železo. Po zhodnocení všech těchto skel se vyjadřujeme k celkové buněčnosti KD vzhledem k věku a k charakteristikám jednotlivých buněčných řad hematopoézy, konkrétně k jejich proporcionálnímu zastoupení, topografii, morfologii a vyzrávání. Dále je standardem každého vyšetření i zhodnocení krevních sinusoid, trámčů kostní spongiózy, zásob železa a stupně fibrotizace.^{11,12,13}

Následuje imunohistochemická analýza materiálu, která zvýrazní jednotlivé buněčné řady hematopoézy. Ke každé trepanobiopsii jsou standardně použity tyto protilátky: Myeloperoxidase, CD71, Glycophorin A, CD61, CD68, CD20, CD3, CD34, CD117, CD138, Kappa a Lambda a podle diagnózy se případně dle potřeby doplňují protilátky další. Po zhodnocení základního barvení, všech barvení speciálních a kompletní imunohistochemické analýzy má již hematopatolog dostatek informací pro to, aby stanovil diagnózu, na kterou klinici a pacient čekají. Výsledek trepanobioptického vyšetření má oproti klinické předběžné diagnóze vždy přibližně týden zpoždění, neboť odběr z KD se musí správně zpracovat, fixovat a odvápnit. Při úspěšání jednotlivých kroků v preanalytické fázi může totiž dojít k nevratnému poškození vzorku a k výraznému omezení či úplnému znemožnění stanovení správné diagnózy.^{11,12,13}

Digitální cytomorfologie KD založená na umělé inteligenci

V poslední době došlo k bezprecedentnímu vývoji v oblasti automatizované klasifikace obrazu a rozhodování s podporou umělé inteligence (AI). Diagnostická aplikace a integrace téměř dokonalé virtuální morfologie a algoritmů rozpoznávání a klasifikace buněk založených na systémech strojového učení a hlubokého učení (subdomény AI) představují skutečnou revoluci v morfologické analýze krevních buněk. Zobrazení celého nátěru umožňuje pořízení komplexních digitálních dat během několika minut. Tento postup se používá v histopatologii, ale v hematologické cytopatologii vyžaduje mnohem větší zvětšení (100× objektivy olejové imerze).^{14,15} Algoritmy AI brání chybné klasifikaci identifikací detailů, které by mohly uniknout lidskému oku, ale mohou také otevřít zcela nekonvenční způsoby interpretace obrazových dat zejména při znalosti skupinového buněčného kontextu analyzovaných populací.^{16,17}

Existují různé komerční systémy pro preklasifikaci buněk PK v běžné laboratorní praxi. Nejrozšířenější systém CellaVision (Lund, Švédsko) je schopen plně skenovat nátěr periferní krve, vyhledávat buňky, zaznamenávat jejich snímky, preklasifikovat buňky a zobrazovat je na obrazovce počítače. Odborník pak zkontroluje navrženou klasifikaci buněk.¹⁷ Morphogo (ZhiWei, Hangzhou, Čína) je unikátní automatické cytopatologické zařízení s certifikací CE-IVDR (In vitro Medical Devices Regulation), UKCA (UK Conformity Assessed Marking) a TGA (Therapeutic Goods Administration) s integrovaným skenovacím hardwarem a softwarem na bázi strojového učení. Je schopen plně skenovat nátěry PK a KD. Samoučící algoritmus rozpoznávání buněk pomocí AI je schopen lokalizovat a preklasifikovat jaderné elementy (a abnormální erytrocyty v PK) a provádět statistickou analýzu pro kompletaci myelogramu. Zařízení také ukládá kompletní datové informace ve formě digitálních fotografií.^{17,18} Velké validační studie prokázaly, že Morphogo vykazuje vysokou přesnost v klasifikaci buněk a robustní a stabilní konzistenci s profesionálními hematopatologi, v některých případech dosahuje dokonce superhumánní úrovně.¹⁸ Tento systém je leadrem v digitalizaci morfodiagnostiky KD a jeho rutinní implementace bude mít významný dopad na pracovní postupy v hematologických laboratořích.¹⁶

Tak například se předpokládá, že v rámci zralých lymfoidních novotvarů by další trénink a zlepšení rozpoznávacích algoritmů mohly umožnit a usnadnit i subklasifikaci do specifických diagnostických entit.¹⁹ Velký prostor také zůstává pro spolehlivé rozpoznání liniových dysplastických změn podporované AI.

Mezi výhody kompletního skenování a automatizované digitální analýzy patří bezprecedentní rychlost zpracování, vzdálený přístup, snížení pracovní únavy, nákladů a redukce počtu revizí optickou mikroskopií, významné zlepšení morfologického vzdělávání a dále též standardizace, harmonizace a zajištění kvality eliminující subjektivitu hodnocení. Virtuální sklíčka se časem nezhoršují, mají minimální požadavky na skladování a jsou dostupnější pro prohlížení, konzultace a publikace a vytváření digitálních obrazových archivů, rozsáhlých databází a knihoven.^{14,15,18,20}

Ačkoliv se AI v průtokové cytometrii běžně nepoužívá, klasifikátory asistované AI již byly navrženy také pro kvantitativní imunofenotypizaci v hematologii a automatizovanou kvantifikaci minimální reziduální choroby.^{21,22}

Diagnostika s podporou umělé inteligence má obrovský potenciál pro další zlepšení a inovativní transformaci diagnostické hematologie. V nejbližší budoucnosti se dočkáme implementace AI směřující k překonání konvenční analýzy v rutinní praxi, včetně standardizace barvicích metod, kvality obrazu, rozpoznávání buněk, kvalitativního hodnocení a harmonizace a standardizace procesů.^{14,16,19} Technologický pokrok využívající AI nelze v této oblasti zastavit, ale vysoce kvalifikovaný morfolog bude

vždy nezbytný pro reklasifikaci buněk a diagnostickou interpretaci; expertíza tak zůstává základním kamenem cytomorfoloické diagnostiky v hematologii.^{18,20}

Validace cytomorfoloie kostní dřeně

Validace je potvrzení prostřednictvím poskytnutí objektivních důkazů, že požadavky na specifické zamýšlené použití nebo na specifickou aplikaci byly splněny.

Metody validace morfoloického vyšetření kostní dřeně nejsou standardizovány. Doporučení ICSH o této oblasti kromě kontroly kvality detailně nepojednávají.^{11,12} Provedené validační studie byly založeny zejména na intra-expertní a interexpertní komparativní analýze.^{23,24} Validace a kontrola kvality flow-cytometrické imunofenotypizace v hematologii by měla vždy zahrnovat také interpretační část postanalytické fáze.²⁵ Přesvědčivá data týkající se komplexní diagnostické validace morfoloického vyšetření kostní dřeně nebyla doposud publikována. Taková data nejsou dostupná ani pro digitální morfoloii kostní dřeně.^{16,18,20}

Reference:

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Arber DA, Hasserjian RP, Le Beau MM, Orazi A, Siebert R. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised 4th Edition, IARC, Lyon 2017.
2. Starostka D. et al.: Možnosti diagnostiky CD5-pozitivních B-lymfoproliferací, *Onkologie* 2014; 8(3): 102-106.
3. Pecka M et al. Praktická hematologie. Laboratorní metody. První vydání. Nakladatelství Infiti art, s.r.o., Český Těšín, 2010.
4. Marinov I. Průtoková cytometrie v klinické hematologii. 2. přepracované a rozšířené vydání. Triton, Praha. 2008.
5. Novák M. Mechanizmy navozené imunotolerance nádorových buněk cestou dráhy programové buněčné smrti u chronické lymfocytární leukémie a možnosti jejich detekce metodami průtokové cytometrie. Dizertační práce. Univerzita Palackého, Lékařská fakulta, Olomouc 2015.
6. Pospíšilová Š, Dvořáková D, Mayer J et al. Molekulární hematologie. Galén, Praha. 2013.
7. Böcker W, Buchwalow IB. Immunohistochemistry: Basics and methods. Springer. 2010.
8. Richard KK, Robinett S. Detection of genetic translocations in lymphoma using fluorescence in situ hybridization. *Methods Mol Biol* 2013; 999:189-202.
9. Teruya-Feldstein J. Getting the diagnosis right in NHL: role of immunohistochemistry and molecular diagnostic testing. *J Natl Compr Canc Netw* 2008 Apr; 6:422-7.
10. Doporučení laboratorní sekce České hematologické společnosti ČLS JEP: HODNOCENÍ NÁTĚRU ASPIRÁTU KOSTNÍ DŘEŇE.
11. Lee SH, Erber WN, Porwit A, Tomonaga M, Peterson LC; International Council for Standardization In Hematology. ICSH guidelines for the standardization of bone marrow specimens and reports. *Int J Lab Hematol*. 2008 Oct;30(5):349-64. doi: 10.1111/j.1751-553X.2008.01100.x. PMID: 18822060.
12. Palmer L, Briggs C, McFadden S, Zini G, Burthem J, Rozenberg G, Proytcheva M, Machin SJ. ICSH recommendations for the standardization of nomenclature and grading of peripheral blood cell morphological features. *Int J Lab Hematol*. 2015 Jun;37(3):287-303. doi: 10.1111/ijlh.12327. Epub 2015 Mar 2. PMID: 25728865.
13. Torlakovic EE, Brynes RK, Hyjek E, Lee SH, Kreipe H, Kremer M, McKenna R, Sadahira Y, Tzankov A, Reis M, Porwit A; International Council for Standardization in Haematology. ICSH guidelines for the standardization of bone marrow immunohistochemistry. *Int J Lab Hematol*. 2015 Aug;37(4):431-49. doi: 10.1111/ijlh.12365. Epub 2015 May 15. PMID: 25977137.
14. Zini G, Barbagallo O, Scavone F, Béné MC. Digital morphology in hematology diagnosis and education: The experience of the European LeukemiaNet WP10. *Int J Lab Hematol*. 2022 Sep;44 Suppl 1:37-44. doi: 10.1111/ijlh.13908. PMID: 36074713.

15. Walter W, Haferlach C, Nadarajah N, Schmidts I, Kühn C, Kern W et al. T. How artificial intelligence might disrupt diagnostics in hematology in the near future. *Oncogene*. 2021 Jun;40(25):4271-4280. doi: 10.1038/s41388-021-01861-y. Epub 2021 Jun 8. PMID: 34103684; PMCID: PMC8225509.
16. Lin E, Fuda F, Luu HS, Cox AM, Fang F, Feng J, Chen M. Digital pathology and artificial intelligence as the next chapter in diagnostic hematopathology. *Semin Diagn Pathol*. 2023 Mar;40(2):88-94. doi: 10.1053/j.semmp.2023.02.001. Epub 2023 Feb 15. PMID: 36801182.
17. Kratz A, Lee SH, Zini G, Riedl JA, Hur M, Machin S; International Council for Standardization in Haematology. Digital morphology analyzers in hematology: ICSH review and recommendations. *Int J Lab Hematol*. 2019 Aug;41(4):437-447. doi: 10.1111/ijlh.13042. Epub 2019 May 2. PMID: 31046197.
18. Jin H, Fu X, Cao X, Sun M, Wang X, Zhong Y et al. Developing and Preliminary Validating an Automatic Cell Classification System for Bone Marrow Smears: a Pilot Study. *J Med Syst*. 2020 Sep 7;44(10):184. doi: 10.1007/s10916-020-01654-y. PMID: 32894360; PMCID: PMC7476995.
19. Tang G, Fu X, Wang Z, Chen M. A Machine Learning Tool Using Digital Microscopy (Morphogo) for the Identification of Abnormal Lymphocytes in the Bone Marrow. *Acta Cytol*. 2021;65(4):354-357. doi: 10.1159/000518382. Epub 2021 Jul 20. PMID: 34350848.
20. Fu X, Fu M, Li Q, Peng X, Lu J, Fang F et al. Morphogo: An Automatic Bone Marrow Cell Classification System on Digital Images Analyzed by Artificial Intelligence. *Acta Cytol*. 2020;64(6):588-596. doi: 10.1159/000509524. Epub 2020 Jul 28. PMID: 32721953.
21. Starostka D, Kriegova E, Kudelka M, Mikula P, Zehnalova S, Radvansky M et al. Quantitative assessment of informative immunophenotypic markers increases the diagnostic value of immunophenotyping in mature CD5-positive B-cell neoplasms. *Cytometry B Clin Cytom*. 2018 Jul;94(4):576-587. doi: 10.1002/cyto.b.21607. Epub 2018 Jan 17. PMID: 29220870.
22. Bazinet A, Wang A, Li X, Jia F, Mo H, Wang W, Wang SA. Automated quantification of measurable residual disease in chronic lymphocytic leukemia using an artificial intelligence-assisted workflow. *Cytometry B Clin Cytom*. 2023 Feb 23. doi: 10.1002/cyto.b.22116. Epub ahead of print. PMID: 36824056.
23. Ermens AA, VAN Lom K, Van't Veer MB, Bikker G. Quality control of bone marrow cytology; organization and over 7 years experience in the south-west Netherlands. *Int J Lab Hematol*. 2008 Dec;30(6):526-30. doi: 10.1111/j.1751-553X.2007.00994.x. PMID: 18983305.
24. Madelung AB, Bondo H, Stamp I, Loevgreen P, Nielsen SL, Falensteen A, Knudsen H, Ehinger M, Dahl-Sørensen R, Mortensen NB, Svendsen KD, Lange T, Ralfkiaer E, Nielsen K, Hasselbalch HC, Thiele J. World Health Organization-defined classification of myeloproliferative neoplasms: morphological reproducibility and clinical correlations—the Danish experience. *Am J Hematol*. 2013 Dec;88(12):1012-6. doi: 10.1002/ajh.23554. Epub 2013 Sep 30. PMID: 23897670.
25. Owens MA, Vall HG, Hurley AA, Wormsley SB. Validation and quality control of immunophenotyping in clinical flow cytometry. *J Immunol Methods*. 2000 Sep 21;243(1-2):33-50. doi: 10.1016/s0022-1759(00)00226-x. PMID: 10986405.

Cíl projektu:

- a) Validace konvenční cytologické analýzy kostní dřeně stanovené optickou mikroskopií a ověření její standardizace pomocí externí národní a mezinárodní kontroly kvality, mezilaboratorního porovnání a inter-expertní komparace numerických výsledků myelocytogramu. (numerická validace konvenční metody).
- a) Validace konvenční cytologické analýzy kostní dřeně stanovené optickou mikroskopií s podporou nálezu imunofenotypizace průtokovou cytometrií komparací diagnostické interpretační hodnoty této kombinované analýzy a výsledku referenční diagnostické metody, tj. závěrečné diagnózy stanovené standardizovaným postupem (diagnostická validace konvenční metody).
- b) Pilotní validace výsledků automatizované digitální cytomorfolgie kostní dřeně stanovené pomocí zařízení Morphogo na externím pracovišti komparací numerických výsledků

automatizovaného myelocytogramu z externího pracoviště a výsledků referenčního myelocytogramu stanoveného konvenčním postupem (pilotní numerická validace digitálního myelocytogramu).

- c) Identifikace problémových diagnostických oblastí a limitací konvenční cytologické analýzy a digitální morfologie kostní dřeně.
- d) Zvýšení standardizace, harmonizace a kvality konvenční cytologické analýzy kostní dřeně se snížením její subjektivity.
- e) Získání iniciálních zkušeností a praktických dovedností s automatizací myelogramu digitální morfologií s použitím zařízení Morphogo na externím pracovišti.
- f) Start procesu tvorby systematické a didaktické edukační databáze digitálních snímků kostní dřeně a komplexních cytologických nálezů s cílem zlepšení edukace v hematologické cytomorfologii.

Materiál a metodika:

Analyzovaný soubor:

Neselektovaný soubor zahrnuje všechny vzorky kostní dřeně odebrané aspirací a trepanobiopsií v období dubna 2023 – ledna 2024, celkem cca 250 případů. Jde o kombinovanou retrospektivní a prospektivní analýzu. Pro pacienta nepředstavuje studie žádnou zátěž navíc, k analýze slouží rutinně odebírané vzorky. Automatizovaný myelogram se také stanovuje v běžně odebíraných vzorcích. Výsledky studie neovlivní v době jejího průběhu žádným způsobem zdravotní péči o pacienta. Data se ukládají do předdefinované tabulky ve formátu MS Excel (Příloha č. 3). Informovaný souhlas s anonymním využitím výsledků analýzy kostní dřeně k výzkumným účelům je součástí informovaného souhlasu s odběrem kostní dřeně (Příloha č. 4 a 5).

Diagnostická analýza odebraných vzorků:

1. Cytomorfologie kostní dřeně

Mikroskopické hodnocení obarveného nátěru aspirátu KD začíná vždy přehledným zhodnocením při menším zvětšení (200–500×), a to i v okrajích a konečných cípech nátěru, kde mohou být vytlačeny větší buňky či kompaktní shluky patologických buněk. Pak následuje vlastní podrobné hodnocení při zvětšení 1000×. Součástí hodnocení je stanovení relativního rozpočtu hematopoetických buněk (myelogram) a morfologický popis hematopoetických vývojových řad a dalších buněk přítomných v KD a nakonec též diagnostická interpretace nálezu s podporou výsledku FCM. Vyšetření probíhá dle podrobných pravidel uvedených v Úvodu a dle příslušných vyšetřovacích SOP.

Myelogram provádí laborantka se specializovanou způsobilostí. VŠ-JOP se specializovanou způsobilostí reviduje myelogram, provádí kvalitativní cytomorfológické hodnocení KD, formuluje popis cytologického nálezu a navrhuje jeho diagnostickou interpretaci. Garant výkonu - lékař se specializovanou způsobilostí - reviduje cytomorfológický nálezu, interpretuje jej a stanovuje cytologickou diagnózu s podporou výsledku FCM.

Digitální cytomorfológické vyšetření kostní dřeně se stanovením automatizovaného myelogramu se realizuje na spolupracujícím externím pracovišti ve Spolkové republice Německo (Helios Universitätsklinikum Wuppertal). Vyšetření provádí pověřený pracovník LHKB Nemocnice Havířov na zařízení Morphogo nebo reprezentant výrobce Morphogo.

Řešitelé: DS, KCH, MP, PM, BH, JF, MB

2. Imunofenotypizace kostní dřeně průtokovou cytometrií

Multiparametrická průtoková cytometrie se provádí dle pravidel uvedených v úvodu a příslušných vyšetřovacích SOP v rozsahu dle žádanky.

K vyšetření se používají vlastní imunofenotypizační panely:

Malý panel

CD3FITC/8PE/45PerCP/4APC

CD3FITC/16+56PE/45PerCP/19APC

CD19/kappa/lambda

B-lymfoproliferace

CD3FITC/8PE/45PerCP/4APC

CD3FITC/16+56PE/45PerCP/19APC

CD19/kappa/lambda/CD200/CD38

CD19/CD5/CD23/CD79b/FMC7

CD20/CD10/CD43/CD11c/CD103

T-lymfoproliferace

CD3FITC/16+56PE/45PerCP/19APC

CD19/kappa/lambda

CD3/TCR alpha-beta/TCR gamma-delta

CD2/CD5/CD7

Mnohočetný myelom

CD3FITC/8PE/45PerCP/4APC

CD3FITC/16+56PE/45PerCP/19APC

CD38/CD138/CD19/CD56/IC kappa/IC

lambda

Myeloproliferace	CD3FITC/8PE/45PerCP/4APC CD3FITC/16+56PE/45PerCP/19APC CD19/kappa/lambda/CD10 CD34/CD33/CD117/CD15
PNH	CD45/CD15/CD24/FLAER CD45/CD14/CD64/FLAER CD59/CD235a(glykoforin)
Akutní leukémie	CD3FITC/8PE/45PerCP/4APC CD3FITC/16+56PE/45PerCP/19APC CD19/kappa/lambda/CD10 CD45/CD34/CD3/CD79/MPO CD2/CD5/CD7 CD45/CD14/CD64 CD45/CD33/CD16/CD13/CD11b/HLA- DR CD45/CD34/CD117/CD38/CD15

Řešitelé: DS, MP, PM, BH

3. Histologie a imunohistochemie kostní dřeně

Morfologické hodnocení kostní dřeně

Mikroskopické hodnocení nakrájeného a nabarveného trepanobioptického válečku kostní dřeně provádí atestovaný patolog (lékař se specializovanou způsobilostí v oboru patologie), který začíná přehledným posouzením při nejmenším (40x) a malém (100x) zvětšení, ze kterého se vyjadřuje k celkové buněčnosti kostní dřeně vzhledem k věku a ke stavu trámčů kostní spongiozy. Pak následuje hodnocení při zvětšení středně velkém (200x) až velkém (400x), ze kterého se hematopatolog vyjadřuje k charakteristikám jednotlivých buněčných řad hematopoézy, konkrétně k jejich proporcionálnímu zastoupení, topografii, morfologii a vyzrání a dále hodnotí i stav krevních sinusoid, zásoby železa a stupeň fibrotizace.

Imunohistochemická analýza kostní dřeně:

Následuje imunohistochemické vyšetření materiálu, které připraví atestované laborantky dle standardizovaného operačního postupu naší laboratoře pro odečtení atestovaným patologem. Toto vyšetření zvýrazní jednotlivé buněčné řady hematopoézy. Ke každé trepanobiopsii jsou standardně použity tyto protilátky: Myeloperoxidase, CD71, Glycophorin A, CD61, CD 68, CD20, CD3, CD34, CD117, CD138, Kappa a Lambda a podle diagnózy se případně dle potřeby doplňují protilátky další. Konkrétně u B lymfomů se jedná o protilátky CD79a, CD5, CD23, CD10, cyclin D1, SOX11, BCL2, BCL6, PAX5, MUM1,

cMYC. U T lymfomů protilátky CD5, CD4, CD8, CD2, CD56 a CD30. U Hodgkinova lymfomu CD30. U myelomu CD56 a cyclin D1. U systémové mastocytózy CD2 a CD25. U chronické myelomonocytární leukémie se přidává ještě protilátka CD163. U metastáz pak vedle průkazu epitelového charakteru pomocí protilátky CKAE1/3 i protilátky specifické pro daný orgánový systém, např. CK7, CK20, CDX2, TTF1, napsin A, TRPS1, PSA, NKX3, SOX10, melan A, HMB45, OCT3/4, PAX8, RCC a další.

Po zhodnocení základního barvení, všech barvení speciálních a kompletní imunohistochemické analýzy sepíše patolog zprávu s kompletním popisem dodaného materiálu, s interpretací všech provedených vyšetření a v závěru textu stanoví diagnózu, kterou zakóduje v nemocničním informačním systému a vytištěnou zprávu podepíše.

Řešitelé: RD, PK, LČ, LL

4. Cytogenetika a molekulární genetika kostní dřeně

Cytogenetické a molekulárně genetické vyšetření se provádí v externí laboratoři Spadia. Rozsah vyšetření je individualizován dle očekávaného přínosu, požadovaný rozsah vyšetření indikuje ošetřující hematolog. Spektrum poskytovaných genetických analýz shrnují přílohy č. 6 a 7 (žádanky na vyšetření).

Multidisciplinární meeting (MDM):

Multidisciplinární meeting je pracovní porada expertů v diagnostické hematoonkologii (v minimálním složení atestovaný hematopatolog + atestovaný hematolog + expert VŠ JOP z hematologické laboratoře), na které se projednávají všechny případy vyšetření kostní dřeně v Nemocnici Havířov. Výsledkem projednání případu na MDM je diagnostický report z vyšetření kostní dřeně.

Řešitelé: DS, RD, PK, PM, BH

Diagnostický report z vyšetření kostní dřeně:

Diagnostický report z vyšetření kostní dřeně je komplexním souhrnem relevantních klinických a laboratorních dat umožňujících petrifikaci diagnózy založenou zejména na synergii a komplementaritě nálezů.

Diagnostický report z vyšetření kostní dřeně zahrnuje:

- podstatné klinické údaje
- výsledek hemogramu
- výsledek cytomorfologické analýzy kostní dřeně
- výsledek imunofenotypizace kostní dřeně průtokovou cytometrií
- výsledek histologického a imunohistochemického vyšetření kostní dřeně
- výsledek cytogenetické a molekulárně genetické analýzy kostní dřeně, event. genetické analýzy periferní krve
- závěrečnou diagnózu
- event. doporučení pro další diagnostiku.

Diagnostický report z vyšetření kostní dřeně se pořizuje v NIS v oddíle Diagnostické reporty KD s využitím předdefinovaného formátu.

Diagnostický report z vyšetření kostní dřeně kompletuje pověřený lékař hematologické laboratoře.

Závěrečnou diagnózu stanovuje pověřený atestovaný hematolog spolu s primářem patologie, oba report kontrasignují po předchozím projednání případu na multidisciplinárním mítinku.

Diagnostický report z vyšetření kostní dřeně se vydává v elektronické a pro externí uživatele též v listinné podobě.

Pracovní diagnóza je neúplný klinický diagnostický závěr formulovaný na základě průběžných výsledků vyšetření.

Závěrečná diagnóza je závěr diagnostického reportu z vyšetření kostní dřeně. V případě hematomfoidních neoplázií se uvádí dle WHO klasifikace (4. revize i 5. revize).

Finální diagnózu stanovuje klinik při znalosti všech potřebných informací, zejména pak závěrečné diagnózy.

Předdefinovaný formát diagnostického reportu:

Diagnostický report z vyšetření kostní dřeně

Datum odběru kostní dřeně:

Klinické údaje:

Cytomorfologie kostní dřeně:

Imunofenotypizace kostní dřeně průtokovou cytometrií:

Histologie a imunohistochemie kostní dřeně:

Cyto genetická a molekulárně genetická analýza kostní dřeně:

Závěrečná diagnóza:

Datace a signatura

Řešitelé: DS, RD, PK, PM, BH

Výsledkem výše popsané komplexní analýzy kostní dřeně je:

- a) **MYELO-OPT:** Myelocytogram stanovený cytomorfologií s použitím optického mikroskopu a univerzálního pořizovače dat. Vyšetření provádějí nezávisle na sobě dvě laborantky se specializovanou způsobilostí. V prvním stupni validace jde o konvenční validovanou metodu. Ve druhém stupni validace (pilotní validace automatizovaného myelocytogramu) jde o referenční metodu.

- b) **MYELO-MG:** Myelocytogram stanovený automatizovanou digitální morfologií kostní dřeně pomocí zařízení Morphogo na externím pracovišti – preklasifikace. Je podkladem pro MYELO-EXP.
- c) **MYELO-EXP:** Myelocytogram stanovený automatizovanou digitální morfologií kostní dřeně pomocí zařízení Morphogo na externím pracovišti – revize preklasifikace expertem. Ve druhém stupni validace (pilotní validace automatizovaného myelocytogramu) jde o validovanou metodu.
- d) **FCM:** Imunofenotypizace vzorku kostní dřeně průtokovou cytometrií. Závěr formuluje expertní hematolog se specializovanou způsobilostí spolu s cytometrickým expertem JOP. Nález se využívá pro DG-CYTO a DG-MDM.
- e) **DG-CYTO:** Diagnostický závěr cytomorfologického vyšetření kostní dřeně na základě MYELO-OPT s podporou FCM. Závěr stanovuje expertní hematolog se specializovanou způsobilostí spolu s cytologickým expertem JOP. U hematolymfoidních neoplazmat se diagnóza formuluje dle 4. i 5. revize WHO klasifikace. V prvním stupni validace jde o validovanou metodu.
- f) **DG-PAT:** Diagnostický závěr histologického a imunohistochemického vyšetření kostní dřeně z trepanobiopsie. Závěr stanovuje expertní patolog se specializovanou způsobilostí. U hematolymfoidních neoplazmat se diagnóza formuluje dle 4. i 5. revize WHO klasifikace. Jde o komponentu DG-MDM.
- g) **DG-MDM:** Závěrečná diagnóza se stanovuje po kompletaci relevantních diagnostických dat a projednání na multidisciplinárním meetingu, jehož výstupem je diagnostický report z vyšetření kostní dřeně. U hematolymfoidních neoplazmat se diagnóza formuluje dle 4. i 5. revize WHO klasifikace. Jde o referenční závěr pro první i druhý stupeň validace.

Proces dvoukrokové (dvoufázové) validace:

1. krok (fáze) validace:

Numerická komparace 1 (VALID-NUM 1) - komparace numerických výsledků myelocytogramu při nezávislém hodnocení dvěma laborantkami se specializovanou způsobilostí a dlouhodobou úspěšností v národní externí kontrole kvality.

Diagnostická validace 1 (VALID-DG-CYTO) - komparace diagnostického závěru konvenční cytomorfologie kostní dřeně s podporou imunofenotypizace FC a závěrečné diagnózy.

Externí kontrola kvality národní:

Provádí se dvakrát ročně předepsaným hodnocením digitálních fotografií kostní dřeně organizovaným SEKK.

Externí kontrola kvality mezinárodní:

Provádí se dvakrát ročně hodnocením v programu EQAS.

<https://www.instand-ev.de/en/instand-eqas/eqa-program/offer/haematology-09-bone-marrow-cytology/>

Mezilaboratorní porovnání:

Provádí se dvakrát ročně komparací myelogramu a diagnostického závěru mezi referenční expertní laboratoří a hematologickou laboratoří LHKB.

2. krok (fáze) validace:

Numerická komparace 2 (VALID-NUM 2) - komparace numerických výsledků automatizovaného myelocytogramu a konvenčního myelocytogramu.

Diagnostická validace 2 (VALID-DG-MG) - komparace (posouzení kompatibility) výsledku automatizovaného myelocytogramu a závěrečné diagnózy.

- a) **VALID-NUM 1:** Numerická validace se provádí komparací numerických výsledků zastoupení jednotlivých buněčných typů v myelocytogramu získaných při nezávislém hodnocení MYELO-OPT dvěma laborantkami se specializovanou způsobilostí a dlouhodobou úspěšností v národní externí kontrole kvality. Stanoví se přesnost, senzitivita, specifita, korelační koeficient u jednotlivých buněčných typů (tříd) - intra-class correlation coefficient (ICC) dle Pearsona, lineární regrese a současně shoda jednotlivých numerických výsledků. Konkordance (**KON**) výsledku nastává, je-li numerický rozdíl při komparaci u jednotlivého buněčného typu menší než 10 %. Diskordance (**DIS**) výsledku nastává, je-li numerický rozdíl při komparaci 10 % nebo větší.
- b) **VALID-NUM 2:** Numerická validace se provádí komparací numerických výsledků zastoupení jednotlivých buněčných typů v myelogramu získaných při hodnocení MYELO-OPT, MYELO-MG a MYELO-EXP. Referenční metodou je MYELO-OPT. Stanoví se přesnost, senzitivita, specifita, korelační koeficient u jednotlivých buněčných typů (tříd) - intra-class correlation coefficient (ICC) dle Pearsona, lineární regrese a současně shoda jednotlivých numerických výsledků. Konkordance (**KON**) výsledku nastává, je-li numerický rozdíl při komparaci menší než 10 %. Diskordance (**DIS**) výsledku nastává, je-li numerický rozdíl při komparaci 10 % nebo větší.
- c) **VALID-DG-CYTO:** Diagnostická validace závěru konvenční cytomorfolgie s podporou FCM se provádí komparací DG-CYTO a DG-MDM. Konkordance (**KON**) diagnózy nastává, je-li

výsledek DG-CYTO shodný s DG-MDM. Diskordance (**DIS**) diagnózy nastává, není-li výsledek DG-CYTO shodný s DG-MDM. V případě širší diferenciální diagnózy při DG-CYTO se za konkordanci považuje kompatibilita.

- d) **VALID-DG-MG:** Diagnostická validace výsledku myelogramu se provádí posouzením kompatibility MYELO-EXP a referenční diagnózy DG-MDM. Konkordance (**KON**) výsledku nastává, je-li výsledek MYELO-EXP kompatibilní s DG-MDM. Diskordance (**DIS**) výsledku nastává, není-li výsledek MYELO-EXP kompatibilní s DG-MDM.

Statistické zpracování výsledků validace:

VALID-NUM 1: Stanoví se přesnost, senzitivita, specificita, korelační koeficient u jednotlivých buněčných typů (tříd) - intra-class correlation coefficient (ICC), lineární regrese a současně shoda jednotlivých numerických výsledků (konkordance, diskordance) v %.

VALID-NUM 2: Stanoví se přesnost, senzitivita, specificita, korelační koeficient u jednotlivých buněčných typů (tříd) - intra-class correlation coefficient (ICC), lineární regrese a současně shoda jednotlivých numerických výsledků (konkordance, diskordance) v %.

VALID-DG-CYTO: Stanoví se soulad jednotlivých výsledků (konkordance, diskordance) v %.

VALID-DG-MG: Stanoví se soulad jednotlivých výsledků (konkordance, diskordance) v %.

Data budou analyzována též sofistikovanými matematickými modely vybranými experty z VŠB-TUO Ostrava.

Závěr: Interpretace a komentář výsledku validace.

Řešitelé: DS, RD, BH, KCH, PK, MP, PM, LČ, LL

Výstup:

- časový harmonogram

Červenec 2023: standardizace multidisciplinárního meetingu 1x za 14 dní, zavedení diagnostického reportu z vyšetření kostní dřeně.

Červenec 2023-leden 2024: komplexní vyšetření cca 250 vzorků kostní dřeně z období duben 2023-leden 2024 (dvojí vyšetření cytologie, průtoková cytometrie, histologie + imunohistochemie, cytogenetika). Průběžný záznam dat. Průběžná validace v 1. kroku.

Červenec 2023-leden 2024: vyšetřování automatizovaného myelogramu na externím pracovišti. Průběžná validace ve 2. kroku.

Leden 2024: submise sdělení do časopisu Transfuze a Hematologie Dnes.

Únor 2024-duben 2024: dokončení 1. a 2. stupně validace. Statistické zpracování dat. Příprava publikačního výstupu.

Březen 2024-červen 2024:

- A) Odborné sdělení na celoustavním semináři Nemocnice Havířov.
- B) Odborná sdělení na národních konferencích a kongresech.
- C) Diagnostický workshop pořádaný Nemocnicí Havířov.

Květen 2024: submise sdělení do Int J Clin Hematol.

Květen 2024-červenec 2024: připomínkové řízení v Int J Clin Hematol.

- očekávané výsledky

Nulová hypotéza:

Rozdíl ve výsledku myelogramu při nezávislém hodnocení dvěma experty v rutinním provozu je statisticky a diagnosticky nevýznamný.

Rozdíl ve výsledku myelogramu při nezávislém konvenčním expertním hodnocení a automatizovaném vyšetření zařízením Morphogo s expertní supervizí je statisticky a diagnosticky nevýznamný.

- A) Numerická validace konvenční metody.
- B) Diagnostická validace konvenční metody.
- C) Pilotní numerická validace digitálního myelogramu s potvrzením non-inferiority či superiority digitální morfologie s možností zavedení do rutinní analýzy.
- D) Identifikace problémových diagnostických oblastí a limitací konvenční cytologické analýzy a digitální morfologie kostní dřeně.
- E) Zvýšení standardizace, harmonizace a kvality konvenční cytologické analýzy kostní dřeně se snížením její subjektivity. Zavedení mezinárodní externí kontroly kvality a mezilaboratorního porovnání.
- F) Získání iniciálních zkušeností a praktických dovedností s automatizací myelogramu digitální morfologií s použitím zařízení Morphogo na externím pracovišti.
- G) Start procesu tvorby systematické a didaktické edukační databáze digitálních snímků kostní dřeně a komplexních cytologických nálezů.

- povinný publikační výstup

- A) J_{imp} (původní/přehledový článek v odborném periodiku, který je obsažen v databázi Web of Science): originální sdělení v časopisu Int J Lab Hematol
- B) JSC (původní/přehledový článek v recenzovaném odborném periodiku, který je obsažen v databázi SCOPUS): přehledné sdělení v časopisu Transfuzie a Hematologie Dnes

- další publikační a prezentační výstupy

- A) Odborné sdělení na celoustavním semináři Nemocnice Havířov.
- B) Odborná sdělení na národních konferencích a kongresech.
- C) Diagnostický workshop pořádaný Nemocnicí Havířov.

- přínos pro praxi

1. Zvýšení kvality cytomorfologické analýzy kostní dřeně v hematologické laboratoři.
2. Zvýšení standardizace, harmonizace a zajištění kvality cytomorfologické analýzy omezením subjektivity hodnocení.
3. Zavedení mezinárodní externí kontroly kvality a MLP cytologického vyšetření kostní dřeně do do rutinního diagnostického procesu.
4. Zavedení multidisciplinárního týmu a diagnostického reportu z vyšetření kostní dřeně do rutinního diagnostického procesu.
5. Získání iniciálních zkušeností a praktických dovedností s automatizací myelogramu digitální morfologií s použitím zařízení Morphogo na externím pracovišti.
6. Pilotní validace automatizovaného myelogramu získaného s využitím zařízení Morphogo, identifikace problémových oblastí a limitací digitální morfologie kostní dřeně.
7. Příprava instalace zařízení pro automatizovanou cytomorfologii kostní dřeně Morphogo v hematologické laboratoři LHKB NemHav.
8. Start procesu tvorby systematické a didaktické edukační databáze digitálních snímků kostní dřeně a komplexních cytologických nálezů.

Požadavky na výsledky z projektů:

Druh požadovaných výsledků podle kategorií rejstříků informací o výsledcích (RIV):

- Povinné jsou dva výsledky pro každý projekt:

PRVNÍ povinný výsledek pro každý projekt	DRUHÝ povinný výsledek pro každý projekt (možnosti)
J _{imp} - původní/přehledový článek v odborném periodiku, který je obsažen v databázi Web of Science	J _{imp} - původní/přehledový článek v odborném periodiku, který je obsažen v databázi Web of Science
	B - odborná kniha
	C - kapitola v odborné knize
	P - patent
	F _{prum} , F _{uzit} - průmyslový vzor, užitný vzor
	N _{met} - certifikovaná metodika
	JSC - původní/přehledový článek v recenzovaném odborném periodiku, který je obsažen v databázi SCOPUS

Ekonomika

Náklady projektu

- Investiční náklady nevznikají.

- **Osobní náklady** jsou uvedeny níže: **217 373 Kč**
- **Materiálové náklady:** náklady na mezinárodní EKK: **4 000 Kč**

<https://www.instand-ev.de/en/instand-eqas/eqa-program/offer/haematology-09-bone-marrow-cytology/>

Náklady na pořízení laboratorního stolu pro zařízení Morphogo: **7 500 Kč**

<https://www.b2bpartner.cz/kancelarsky-stul-primo-invitation-sedostribrna-podnoz-2000-x-1000-mm-briza/?scrollTo=top>

- **Nákup literatury** – tištěná verze WHO klasifikace nádorů hematopoetické a lymfoidní tkáně, 5. revize: **5 000 Kč.**
- **Náklady na editaci odborného textu a open access poplatky:** **30 000 Kč.**

Celkové náklady projektu činí **263 873 Kč.**


Osobní náklady podklady - Interní grantová soutěž Nemocnice Havířov 2023

Jméno řešitelský tým*	celková navrhovaná částka za projekt (max 50 000 Kč/1 osobu)	zapojení v jednotlivých letech		
		2023	2024	
MUDr. David Starostka, Ph.D. (DS)	35 937	ANO	ANO	ANO/NE
MUDr. Richard Doležilek (RD)	35 946	ANO	ANO	
Mgr. Kateřina Chasáková (KCH)	26 283	ANO	ANO	
Mgr. Petra Miczková (PM)	26 506	ANO	ANO	

Jméno - další pracovníci Nemocnice Havířov**	celková navrhovaná částka za projekt (max 50 000 Kč/1 osobu)	zapojení v jednotlivých letech		
		1. rok	2. rok	
MUDr. Michael Paprota (MP)	12 140	ANO	ANO	ANO/NE
MUDr. Peter Kováč (PK)	12 042	ANO	ANO	
Mgr. Barbora Haroková (BH)	14 865	ANO	ANO	
Jana Fojtíková (JF)	14 882	ANO	ANO	

Monika Borovcová (MB)	14 554	ANO	ANO
Lydie Čechmánková (LČ)	12 107	ANO	ANO
Lenka Lipková (LL)	12 111	ANO	ANO

Za řešitelský a realizační tým:



MUDr. David Starostka, Ph.D.

Havířov 20.6.2023