



Via Zeneghe 15, Tisoi – 32100 BELLUNO
Tel. e Fax: 0437 294063
e-mail: info@nuovitragedi.it

**PROGETTO PER UN APPROCCIO GLOBALE
ALLE MALATTIE ONCOEMATOLOGICHE
IN UN TERRITORIO MONTANO
CON RISORSE LIMITATE.**

**Utilizzazione ottimale
delle professionalità esistenti
secondo un modello trasversale.**

**Prima fase:
sviluppo dell'attività diagnostica ematologica
del Laboratorio analisi
tramite l'assegnazione di due borse di studio.**

1.1- Istituzione proponente e legale rappresentante.

Associazione “Nuovi Traguardi” per la lotta contro le malattie del sangue, ONLUS (allegato A: Statuto dell’Associazione).

Rappresentante legale: **dott. Donato Manfroi**, Presidente.

Indirizzo: Via Roma 56 – 32020 Cencenighe Agordino (BL)

Telefono: 0437-591130

1.2 - Coordinatore scientifico del progetto di ricerca.

dott. Graziano Pianezze

Indirizzo: Via Valgrande 4/c, 32022 Alleghe (BL).

Telefono: 0437-723870, 349 5716841

1.3 - Titolo del progetto di ricerca.

Progetto per un approccio globale alle malattie oncoematologiche in un territorio montano con risorse limitate.

Utilizzazione ottimale delle professionalità esistenti secondo un modello trasversale.

Prima fase: sviluppo dell’attività diagnostica ematologica del Laboratorio analisi tramite l’assegnazione di due borse di studio.

Il progetto è proposto dall’Associazione “Nuovi Traguardi” **in collaborazione con l’ULSS n°1 di Belluno**.

1.4 - Linea del bando a cui si riferisce il progetto.

Progetti di ricerca ad **indirizzo biomedico**, linea b: **approcci epidemiologici, clinico-diagnostici e protocolli terapeutici.**

1.5 - Sommario.

Il presente progetto s’inserisce in uno più ampio, disegnato dal “Gruppo Ematologico” dell’Ospedale S. Martino di Belluno (allegato B: progetto del Gruppo Ematologico).

In sintesi, il progetto complessivo prevede i seguenti obiettivi principali.

- **Realizzazione di un osservatorio epidemiologico per le malattie oncoematologiche nell’ULSS n°1.**
- **Stesura di protocolli diagnostico-terapeutici per le principali malattie oncoematologiche.**
- **Realizzazione di una cartella clinica ematologica su supporto informatico.**
- **Partecipazione a Gruppi di studio e Trials clinici sperimentali coordinati da Centri Ematologici di secondo livello.**
- **Adesione a registri nazionali per le malattie ematologiche.**
- **Aggiornamento per il personale medico e infermieristico.**
- **Aggiornamento dei medici di Medicina Generale.**
- **Discussione di novità diagnostico-terapeutiche.**
- **Discussione collettiva di casi clinici di particolare interesse diagnostico o terapeutico.**
- **Segnalazione alla Commissione Terapeutica Ospedaliera di nuovi farmaci da introdurre nel Prontuario Terapeutico Ospedaliero.**

- **Proposta d'introduzione di nuove tecniche d'indagine.**
- **Stesura di progetti di ricerca in campo ematologico.**
- **Sviluppo dell'attività diagnostica Ematologica del Laboratorio Analisi e dell'Anatomia Patologica.**

Il Gruppo Ematologico si è costituito nel mese di ottobre 2002, come risposta alle istanze dell'Associazione "Nuovi Traguardi", che ha individuato e denunciato le carenze concernenti la diagnosi e la terapia delle malattie oncoematologiche in provincia di Belluno.

Poiché l'istituzione di un reparto ematologico non è nemmeno proponibile per una provincia a bassa densità demografica come Belluno, alcuni Medici ospedalieri che nutrono particolare interesse per l'Ematologia, hanno individuato un modo alternativo per elevare il livello delle prestazioni fornite a questi malati.

I medici del Gruppo svolgono la loro attività in vari reparti ospedalieri: Medicina, Oncologia, Pediatria, Laboratorio analisi ed Anatomia patologica; nessuno si occupa esclusivamente di Ematologia, ma mette a disposizione le proprie competenze per la realizzazione di una sorta di **unità ematologica trasversale**.

I punti di forza del progetto del Gruppo sono rappresentati dalla stesura di protocolli diagnostico-terapeutici per le malattie oncoematologiche e dalla partecipazione a gruppi di studio e trias clinici sperimentali coordinati da centri ematologici di secondo livello. La realizzazione di questi due obiettivi permetterà ai pazienti ematologici di fruire delle terapie più moderne ed efficaci.

Il Gruppo ha ritenuto di dare priorità allo sviluppo dell'attività diagnostica per il Laboratorio Analisi.

L'apporto di nuovo personale tramite apposite borse di studio permetterà infatti di colmare le attuali carenze e liberare risorse per affrontare gli altri obiettivi del progetto.

1.6 - Durata del progetto.

La prima fase del progetto prevede l'assegnazione di due borse di studio **per un periodo di due anni**.

1.7- Discipline interessate dal progetto

Il progetto prevede l'assegnazione di una borsa di studio ad un Medico specialista in Ematologia o, alternativamente, ad un Medico specialista in Biochimica Clinica. La seconda borsa di studio sarà assegnata ad un Tecnico di Laboratorio. La disciplina in cui saranno impiegati entrambi i borsisti è l'**Ematologia diagnostica**.

Lo sviluppo dell'attività diagnostica Ematologica del Laboratorio analisi dell'Ospedale S. Martino di Belluno è parte integrante di un più ampio progetto, sviluppato dal Gruppo Ematologico per un **approccio globale all'Oncoematologia: epidemiologico, diagnostico e terapeutico**. I professionisti componenti il Gruppo Ematologico appartengono a diverse discipline: Medicina Interna, Ematologia, Pediatria, Biochimica Clinica ed Istopatologia.

1.8 - Parole chiave

Belluno, Ospedale S. Martino, Oncoematologia, Epidemiologia, Diagnosi, Terapia, Borse di studio, Laboratorio analisi.

1.9 - Curriculum scientifico del coordinatore.

- Diploma di Perito Chimico nel 1970.
- Diploma di Tecnico di Laboratorio nel 1973.
- Diploma di laurea in Medicina e Chirurgia nel 1984.
- Diploma di specialista in Ematologia nel 1988.
- È Capotecnico presso il Laboratorio annesso alla Divisione di Ematologia di Bolzano dal 1974 al 1988 (continua a lavorare in tutto il periodo degli studi universitari).
- Dal 1988 al 1991 è Assistente Medico supplente al Centro Trasfusionale dell'Ospedale di Agordo.
- Nel 1992 è Capotecnico presso il Laboratorio di Ematologia di Bolzano.
- Dal 1993 al 1996 è Aiuto di ruolo al Servizio Trasfusionale dell'Ospedale di Belluno.
- Dal 1996 al 2000 è Dirigente Medico, responsabile del Modulo di Ematologia del Laboratorio analisi di Belluno.
- Dal 2000 al 2002 esercita libera professione come specialista Ematologo a Bolzano. Durante questo periodo è responsabile del Laboratorio di Ematologia e partecipa a tutte le attività divisionali (allegato C: lettera di referenze).
- Dal 2002 ad oggi, è ancora responsabile del Modulo di Ematologia presso il Laboratorio analisi di Belluno; in questo periodo svolge attività di consulente esterno presso l'Ematologia di Bolzano.
- Dal 1985 è membro della Società Italiana di Ematologia.
- Dal 1986 partecipa a numerosi congressi di Ematologia, nazionali ed internazionali.
- Dal 1988 al 1991 insegna Immunologia ed Immunoematologia alla scuola Infermieri dell'Ospedale di Agordo.
- Dal 1995 ad oggi svolge attività libero-professionale intramurale come Ematologo all'Ospedale di Belluno.
- Dal 2000 è consulente scientifico dell'Associazione "Nuovi Traguardi".
- Da ottobre 2002 è membro del Gruppo Ematologico dell'Ospedale S. Martino.

Pubblicazioni importanti o recenti (Allegato D, pubblicazioni ed opuscoli):

- Emergency splenectomy in hairy cell leukemia:
Acta haematologica 1985-74-116.
- Studio statistico-epidemiologico sulle malattie linfoproliferative in Alto Adige (anni 1977-1983): Atti Regionali della S.I.E. (Sezione Trentino Alto Adige);
Suppl. di "haematologica" 1985 Vol. I°Nr. 2-241.
- Immunoblastic lymphoma following therapy for Hodgkin's disease. A case report:
Haematologica 1986-71-50.
- Cytoplasmic immunoglobulins in chronic lymphocytic leukemia B cells:
Blood 1987-69-1011.
- Successful treatment of a steroid-resistant form of idiopathic thrombocytopenic purpura in pregnancy with high doses of intravenous immunoglobulins:
Acta haematologica 1987-77-107.
- Leucemie acute ibride: incidenza e rilevanza clinica. In "Corso di aggiornamento in citoimmunologia, biologia e clinica delle mielodisplasie e leucemie acute dell'anziano". Bolzano, 17-18 novembre 1989, pagg. 125-6.
- "Isolated" peritoneal granulocytic sarcoma with molecular and chromosomal bone marrow involvement:
Haematologica 2002-87-(01)EIMO1.
- A further case of acute myeloid leukemia with inv(8)(p11q13) and MOZ-TIF2 fusion:
Haematologica 2002-87-(05)ECR15.

Nel corso degli anni 2000, 2001 e 2002 ha redatto una serie di dieci opuscoli informativi per i pazienti, uno per ogni malattia oncoematologica.

La realizzazione degli opuscoli è stata curata dall'Associazione "Nuovi Traguardi", con il contributo economico della Regione Veneto. I libretti sono stati affidati alle ULSS provinciali perché ne curino la consegna gratuita ai pazienti dopo la diagnosi.

Gli argomenti trattati dai singoli opuscoli sono i seguenti:

1) Leucemie acute, 2) Leucemia mieloide cronica, 3) Leucemia linfatica cronica, 4) Linfoma di Hodgkin, 5) Linfomi non Hodgkin, 6) Mieloma multiplo, 7) Malattie mieloproliferative croniche, 8) Sindromi mielodisplastiche, 9) Aplasia midollare ed emoglobinuria parossistica notturna, 10) Trapianto di midollo osseo.

1.10 - Enti partecipanti e ricercatori.

Il progetto complessivo del Gruppo Ematologico è stato approvato dalla **Direzione dell'ULSS n°1**, in seno alla quale troverà la sua naturale attuazione.

Il responsabile del settore di Ematologia del Laboratorio analisi, dott. Graziano Pianezze, ha il compito di curare la sezione relativa allo sviluppo dell'attività diagnostica ematologica; perciò è anche referente per la prima fase del presente progetto.

Il personale del settore di Ematologia è attualmente composto dal Responsabile e da un Tecnico di laboratorio part-time che si occupa degli esami di routine. Pertanto, **non sono previsti collaboratori per la realizzazione del progetto di sviluppo dell'attività diagnostica, tranne ovviamente coloro ai quali saranno assegnate le borse di studio.**

L'ULSS n° 1 parteciperà economicamente alla realizzazione di questa fase del progetto tramite la copertura del previsto aumento di budget per reattivi ed attrezzature.

All'Associazione "Nuovi Traguardi" è stato riconosciuto il ruolo di partner per il reperimento dei fondi necessari al pagamento delle due borse di studio.

1.11 - Curriculum degli altri ricercatori partecipanti al progetto.

Vedere il punto 1-10.

1.12 - Mesi uomo complessivi annui dedicati al progetto di ricerca.

Per il **coordinatore** è previsto un impegno di **4 mesi l'anno** (8 mesi complessivi). Il tempo restante sarà destinato allo svolgimento delle attività istituzionali.

Per il **laureato Medico borsista** è previsto un impegno di **12 mesi l'anno** (24 mesi complessivi).

Per il **Tecnico di Laboratorio borsista** è previsto un impegno di **12 mesi l'anno** (24 mesi complessivi).

2.1 - Obiettivi del progetto complessivo.

- **Creazione di un osservatorio epidemiologico** per l'ULSS n°1, tramite i dati raccolti dal CED per i ricoveri e da una cartella clinica informatizzata per i pazienti ambulatoriali.
- **Stesura di protocolli diagnostico-terapeutici.** Per chemioterapie intensive, procedure trapiantologiche o terapie innovative, identificazione dei Centri di secondo livello cui affidare i pazienti ed avvio di una fattiva collaborazione; i criteri dovranno ispirarsi alla solidità scientifica dei protocolli terapeutici in uso.
- **Espansione dell'attività diagnostica del Laboratorio e dell'Istopatologia.**

2.2 – Presupposti scientifici e riferimenti bibliografici.

L'incidenza per le leucemie acute è di circa 6 nuovi casi/10⁵ persone/anno; per le sindromi mielodisplastiche 6 casi/10⁵/anno, per le malattie mieloproliferative croniche (leucemia mieloide cronica, policitemia vera, trombocitemia essenziale e mielofibrosi idiopatica) 6 casi /10⁵/anno, per la leucemia linfatica cronica 4 casi/10⁵/anno, per i linfomi non Hodgkin 17 casi/10⁵/anno, per il linfoma di Hodgkin 3 casi/10⁵/anno, per il mieloma multiplo 4 casi /10⁵/anno. L'incidenza complessiva delle neoplasie oncoematologiche è perciò superiore a quella del carcinoma del colon-retto (circa 35 nuovi casi/10⁵/anno) e nei maschi è seconda soltanto al carcinoma del polmone; inoltre, in tutti i Paesi industrializzati l'incidenza di linfomi registra un continuo aumento nell'ultimo ventennio.

Per la provincia di Belluno sono attesi circa 100 nuovi casi di malattie oncoematologiche l'anno.

Il progresso terapeutico degli ultimi vent'anni ha portato all'introduzione di nuovi approcci, costituiti principalmente dal trapianto di cellule staminali emopoietiche, e, più recentemente dall'immunoterapia, dalla radioimmunoterapia e dalla terapia molecolare. Grazie a ciò, per alcune neoplasie ematologiche considerate incurabili fino a pochi anni orsono, oggi si possono ottenere lunghi periodi di remissione in molti casi e guarigioni in molti altri.

Ad esempio, la cura della leucemia mieloide cronica è passata in soli vent'anni dalla chemioterapia con il Busulfano (contenimento della malattia ma non modificazione della storia naturale), ai modificatori biologici con l'Interferone- (prolungamento della fase cronica ma non guarigione), al trapianto allogenico di cellule staminali (guarigione in molti casi, ma praticabile solo per pazienti giovani), all'inibizione dell'attività biologica della proteina di fusione tipica della malattia con l'Imatinib (remissioni molecolari prolungate e forse guarigioni, con un profilo di tossicità estremamente vantaggioso).

Il moltiplicarsi delle opzioni terapeutiche ha visto crescere contestualmente la domanda di prestazioni sempre più specializzate ed articolate. Per accedere a tali prestazioni, molti malati della provincia di Belluno devono essere indirizzati verso Centri onco-ematologici di secondo livello, nel Veneto o in Regioni limitrofe.

Il passaparola e la diffusione su Internet di informazione sulla salute hanno favorito la "fuga" di pazienti verso questi Centri, anche per patologie potenzialmente trattabili nell'ambito delle ULSS provinciali. Inoltre, alcuni Centri tendono a gestire direttamente tutte le fasi del percorso diagnostico-terapeutico e del follow-up, costringendo i pazienti ad inutili quanto costosi viaggi, talvolta solo per il controllo dell'emocromo. Tutto questo è aggravato dalla peculiare conformazione geografica della nostra provincia, che rende i trasferimenti ancora più gravosi.

Tale situazione è stata evidenziata nel corso di una tavola rotonda, organizzata dall'Associazione "Nuovi Traguardi" nel maggio 2000 (allegato E: "Un servizio di Ematologia in provincia di Belluno, perché e come", atti della tavola rotonda).

L'ULSS n°1 di Belluno ha colto per prima gli elementi di interesse della proposta avanzata da "Nuovi Traguardi" e si è costituito il Gruppo Ematologico. Dal mese di ottobre 2002, i componenti del Gruppo si sono incontrati periodicamente per trovare risposte concrete alle istanze dell'Associazione.

Dal canto suo, l'Amministrazione dell'ULSS ha provveduto all'assunzione di uno specialista Ematologo presso la divisione di Medicina dell'Ospedale S. Martino, che è subito entrato a far parte del Gruppo.

2.3 – Descrizione del progetto di ricerca.

A: progetto generale.

Come si evince dall'allegato B, il progetto generale elaborato dal Gruppo Ematologico dell'Ospedale S. Martino ha i seguenti obiettivi:

➤ **Realizzazione di un osservatorio epidemiologico per le malattie oncoematologiche nell'ULSS n°1.**

La realizzazione di quest'obiettivo dovrà essere conseguita in collaborazione con il Centro Elaborazione Dati dell'ULSS. A tale scopo si ritiene indispensabile la realizzazione di una cartella clinica informatizzata per i pazienti affetti da tali malattie. Oltre che permettere elaborazioni epidemiologiche, essa renderà disponibili in tempo reale i dati clinici di ogni singolo paziente a tutti i componenti del Gruppo, migliorando l'integrazione fra i versanti diagnostico e terapeutico. A tale proposito sarà necessario revisionare la classificazione delle malattie oncoematologiche secondo le recenti indicazioni dell'Organizzazione Mondiale della Sanità ¹; ciò permetterà di omogeneizzare le definizioni della malattia e della prognosi, in vista di collaborazioni future con diversi Centri Ematologici di secondo livello.

È stata individuata la possibilità di acquisire il programma per la gestione delle cartelle cliniche da una ditta di Bolzano che lo sta preparando per la locale divisione di Ematologia.

L'associazione "Nuovi Traguardi" si rende disponibile al finanziamento dell'operazione, che dovrebbe costituire la seconda fase del progetto.

➤ **Stesura di protocolli diagnostico-terapeutici per le principali malattie oncoematologiche.**

Finora si sono stabiliti i protocolli per la Leucemia Linfatica Cronica, per il Linfoma Follicolare, per il Linfoma Diffuso a Grandi Cellule B e per il Linfoma a Cellule Mantellari. I protocolli sono stati redatti tenendo conto di Linee Guida nazionali ed internazionali. Inoltre, sono stati valutati i protocolli e i Trials clinici attivi presso i Centri di secondo livello, regionali e di Regioni limitrofe. I pazienti candidati a chemioterapia ad alte dosi, a trapianto o a terapie sperimentali non effettuabili in sede locale, saranno indirizzati verso quei Centri che adottano i protocolli con le evidenze scientifiche più solide. Quest'ultimo punto è molto importante perché prevede l'abbandono della consuetudine di scegliere il Centro geograficamente più vicino e permette di offrire la terapia migliore al paziente. Ovviamente tutto questo esige che il paziente sia debitamente informato delle varie opzioni terapeutiche, dei principi su cui si basano, delle probabilità di cura definitiva e dei rischi che comportano. Gli opuscoli informativi che "Nuovi Traguardi" ha messo a disposizione gratuitamente per i malati oncoematologici (allegato D) potranno senz'altro essere di aiuto ai Medici nel difficile compito dell'informazione.

La stesura dei protocolli diagnostico-terapeutici richiede la consultazione di molte fonti, perciò procede piuttosto a rilento. Si prevede che l'avvio della prima fase del progetto, con l'assegnazione di due borse di studio per il Laboratorio, liberi almeno parzialmente le risorse umane necessarie per accelerare il completamento di quest'obiettivo di importanza primaria.

Comunque, il Gruppo Ematologico ha già conseguito un risultato di rilievo: l'inserimento di due nuovi farmaci nel Prontuario Terapeutico Ospedaliero, il Rituximab e lo Zoledronato. Il primo è un anticorpo monoclonale umanizzato contro l'antigene CD20, usato nella terapia dei Linfomi a cellule B. Il secondo è un composto che contrasta la demineralizzazione del tessuto osseo nel Mieloma Multiplo.

➤ **Adesione ai registri nazionali per le malattie ematologiche.**

Finora non è stata intrapresa alcuna iniziativa per la realizzazione di quest'obiettivo.

➤ **Aggiornamento per il personale medico e infermieristico.**

Una delle sfide lanciate da “Nuovi Traguardi” e raccolte dal Gruppo Ematologico è ridurre all’indispensabile la permanenza del paziente nel Centro di secondo livello dove ha effettuato terapie non praticabili in sede locale.

Ciò presuppone un’adeguata preparazione del personale medico ed infermieristico per la diagnosi e il trattamento delle complicanze precoci o tardive della chemioterapia ad alte dosi e del trapianto di cellule staminali (infezioni, mucositi, malattia da rigetto del trapianto verso l’ospite acuta e cronica).

Soltanto quando sarà acquisita una sufficiente esperienza nella gestione di tali complicanze, si potrà instaurare un rapporto di fiducia reciproca con i Centri di secondo livello, base indispensabile per un’effettiva collaborazione.

Proprio In questo periodo “Nuovi Traguardi” sta lavorando alla realizzazione di stages formativi per infermieri dei reparti di Oncologia e Medicina dell’Ospedale S. Martino. Gli stages coinvolgeranno sei infermieri per otto mesi complessivi e si svolgeranno presso il Day Hospital Ematologico dell’Ospedale di Bolzano nel periodo di due anni.

Gli stagisti avranno modo di approfondire la conoscenza delle tecniche di nursing praticate in una struttura ad alta specializzazione ematologica.

Naturalmente, simili iniziative sono previste anche per il personale medico e saranno dedicate all’apprendimento di nuove modalità di diagnosi e terapia.

➤ **Aggiornamento dei medici di Medicina Generale.**

Per il 24 ottobre 2003 è stato organizzato un incontro formativo per i medici di Medicina Generale dell’ULSS n° 1, sul tema delle malattie mieloproliferative croniche. L’incontro avrà anche lo scopo di pubblicizzare le iniziative e i progetti del Gruppo Ematologico.

➤ **Introduzione di nuove tecniche diagnostiche.**

In relazione a quest’obiettivo, il Gruppo Ematologico ha già ottenuto alcuni importanti risultati. Si sono concordati i protocolli diagnostici per le principali malattie oncoematologiche; essi coinvolgono sia l’Anatomia Patologica con tecniche di immunoistochimica, citogenetica, ibridazione in situ a fluorescenza (FISH) e biologia molecolare, sia il Laboratorio analisi con tecniche di citochimica, citofluorimetria a flusso, coltura cellulare, immunometria, colorimetria, elettroforesi e separazione immunomagnetica. Il servizio di Anatomia Patologica ha realizzato rapidamente quanto previsto dai protocolli concordati, mentre il Laboratorio analisi è in difficoltà a causa di un’effettiva carenza di personale. Pertanto il Gruppo, nel contesto generale del proprio progetto, ha ritenuto di dare priorità alla soluzione del problema del Laboratorio analisi.

B: progetto di sviluppo dell’attività diagnostica Ematologica del Laboratorio analisi.

Obiettivi

L’obiettivo generale è costituito dal potenziamento delle prestazioni diagnostiche nel settore di Ematologia del Laboratorio analisi dell’Ospedale S. Martino di Belluno.

In particolare, si ritiene necessario intervenire per i punti sottoelencati:

- **Ottimizzare il flusso di lavoro** per le indagini che già sono eseguite routinariamente. Spesso, per l’effettiva carenza di personale, non è possibile effettuare in tempo utile (max. 24 ore) l’esame del fenotipo di neoplasie ematiche come leucemie e linfomi.
- **Migliorare l’efficienza diagnostica per le seguenti patologie ematologiche.**
 - a) **Anemie Emolitiche**, introduzione dei seguenti tests:
 - autoemolisi, comprese correzioni con ATP e Glucosio ²
 - test di screening per deficit enzimatici ereditari ³
 - studio delle proteine di membrana (sferocitosi, elissocitosi, ecc.) ^{4,5}
 - ricerca emoglobine instabili ⁶
 - test di crioemolisi ⁷

- ricerca autoanticorpi previa stimolazione con mitogeni (MS-DAT) ⁸
 - b) **Emoglobinuria Parossistica Notturna (EPN)**, introduzione dei seguenti tests:
 - test di screening per EPN (CD14 su monociti, CD16 su neutrofili, CD59 su eritrociti) ⁹
 - sugar water test ¹⁰
 - c) **Aplasia Midollare**, introduzione dei seguenti tests:
 - immunofenotipizzazione dei linfociti T midollari ¹¹
 - test di screening per EPN ⁹
 - d) **Granulocitopenie Isolate**, introduzione dei seguenti test:
 - ricerca anticorpi antigranulocitari, metodo citofluorimetrico ¹²
 - test al prednisone ¹³
 - e) **Trombocitopenie Isolate**, introduzione dei seguenti tests:
 - ricerca anticorpi associati alle piastrine, metodo citofluorimetrico ¹⁴
 - test citofluorimetrico per trombocitopenie da eparina ¹⁵
 - f) **Trombocitopatie** (Glanzmann, Bernard - Soulier, etc.):
 - studio immunofenotipico delle glicoproteine di membrana ¹⁶
 - g) **Sindromi Mielodisplastiche**:
 - analisi dell'immunofenotipo di diverse popolazioni cellulari (blasti, monociti, granulociti) con un adeguato pannello di monoclonali (CD14, CD15, CD16, CD33, CD34, CD36, CD38, CD45, CD71 ed HLA-DR) ^{17,18}
 - h) **Leucemia Linfatica Cronica**, introduzione del seguente test:
 - misura quantitativa dell'espressione dell'antigene Zap70 per la valutazione prognostica ¹⁹
 - i) **Leucemie, Linfomi e Mielomi**, introduzione dei seguenti metodi di studio:
 - separazione di popolazioni neoplastiche minoritarie con metodo immunomagnetico per analisi in biologia molecolare, citogenetica e FISH ^{20,21}
 - analisi del contenuto di DNA (ploidia) per valutazione prognostica e ricerca di Malattia Minima Residua ^{22,23,24}
 - j) **Deficit immunitari congeniti ed acquisiti**, introduzione dei seguenti tests:
 - valutazione della fagocitosi ²⁵, del burst ossidativo ²⁶ e della chemiotassi ²⁷ dei neutrofili con metodo citofluorimetrico
 - studio dell'apoptosi per popolazioni cellulari selezionate in citofluorimetria ^{28,29}
 - approfondimento delle indagini nel sospetto di deficit B o T cellulari [sottoclassi IgG ³⁰, immunofenotipo su popolazioni selezionate (CD26, CD27, CD40, CD43, ecc.) ^{31,32,33,34}]
 - k) Infine, **per tutti i campioni di aspirato midollare**:
 - esame citofluorimetrico con CD44, CD45 e 7AAD ³⁵, che consente una valutazione quantitativa rapida ed accurata delle diverse popolazioni cellulari.
 - **Permettere una maggiore elasticità del settore**, con la possibilità di introdurre rapidamente nuovi metodi di studio.
 - **Favorire i contatti quotidiani e il dialogo con i Reparti di degenza e i Servizi**, sia per la discussione di casi clinici, sia per una più sollecita stesura dei protocolli diagnostico-terapeutici, recentemente avviata dal Gruppo Ematologico.

Modalità

È previsto l'utilizzo di apparecchiatura in buona parte già esistente e l'impiego di reattivi già utilizzati per altre indagini.

È invece previsto l'apporto di un laureato Medico e di un Tecnico di Laboratorio, da utilizzare per il raggiungimento degli obiettivi specifici della prima fase del progetto.

Perciò si ritiene necessaria l'assegnazione di due borse di studio per un periodo di due anni, eventualmente prorogabili per il perdurare dell'attuale situazione di cronica carenza di personale.

- Una borsa del valore di 64800 € (2700 € mensili) per il laureato Medico.

➤ Una borsa del valore complessivo di 32400 € (1350 € mensili) per il Tecnico di Laboratorio

Il Tecnico di Laboratorio sarà selezionato da un'apposita Commissione fra quelli disponibili nella graduatoria di concorso dell'ULSS n°1, ancor a vigente.

Il laureato Medico sarà selezionato dalla stessa Commissione fra i neospecialisti in Ematologia o, alternativamente, in Biochimica Clinica che si rendano disponibili dopo una rapida inchiesta telefonica. L'inchiesta riguarderà i neospecialisti delle Università del Veneto e sarà allargata ad altre Regioni soltanto in caso di completa indisponibilità di candidati.

La Commissione, nominata con successivo provvedimento, dovrà comprendere due rappresentanti del Gruppo Ematologico, il Presidente dell'Associazione "Nuovi Traguardi", il Direttore del Laboratorio analisi e il responsabile del settore di Ematologia.

L'attività dei borsisti dovrà svolgersi **esclusivamente** presso il settore di Ematologia del Laboratorio Analisi dell'Ospedale S. Martino, con un impegno di **40 ore lavorative settimanali** per ciascun borsista. Durante il periodo di fruizione della borsa, gli assegnatari non potranno svolgere altro impiego od occupazione. Qualora un borsista, nel corso dell'espletamento della borsa e per finalità strettamente legate alla realizzazione del presente progetto, sia inviato al di fuori della sede di assegnazione, l'Associazione "Nuovi Traguardi" gli rimborserà le spese di viaggio, vitto e alloggio.

I borsisti dovranno provvedere in proprio alla stipula di un contratto assicurativo per infortuni e malattie professionali e all'apertura di una posizione INPS ai fini previdenziali.

Il borsista decadrà dalla borsa e perderà ogni diritto qualora non inizi la frequenza nei termini stabiliti nella lettera di convocazione, rifiuti la sede di assegnazione, si renda responsabile di gravi mancanze o di comportamento indisciplinato.

L'interruzione della frequenza senza giustificato motivo, darà luogo alla cessazione della borsa e l'assegnatario sarà retribuito in proporzione al periodo di attività effettivamente svolta.

Riferimenti bibliografici

1) Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (eds) Pathology and Genetics of tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissue:

International Agency for Research on Cancer, 2001

2) Fukagawa N, Friedman S, Gill FM, Schwartz E, Shaller C: Hereditary spherocytosis with normal osmotic fragility after incubation. Is the autohemolysis test really obsolete? JAMA. 1979 Jul 6;242(1):63-4.

3) Madera-Orsini FM, Volini FI: Screening methods for enzyme defects in erythrocytes. Am. Clin. Lab. Sci. 1972 Jan Feb;2(1):40-56.

4) Bovin P, Galand C: Erythrocyte membrane proteins. I. Electrophoretic study of solubilized erythrocyte membrane proteins from normal and abnormal human erythrocytes. Nouv Rev Fr Hematol. 1974 May-Jun;14(3):355-70.

5) King MJ, Behrens J, Rogers C, Flynn C, Greenwood D, Chambers K: Rapid flow cytometric test for diagnosis of membrane cytoskeleton-associated haemolytic anaemia. Br J Haematol. 2000 Dec;111(3):924-33.

6) Marti HR: Probe test for the detection of hemoglobinopathies and enzyme defect anemias.

Z Gesamte Inn Med. 1983 Feb I;38(3):65-6

- 7) Streichman S, Gescheidt Y: Cryohemolysis for the detection of the hereditary spherocytosis: correlation studies with osmotic fragility and autohemolysis. *Am J haematol.* 1998 Jul;58(3):206-12.
- 8) Barcellini W, Clerici G, Montesano R, Taioli E, Morelati F, Rebulli I, Zanella A: In vitro quantification of anti-red blood cell antibody produced in idiopathic autoimmune haemolytic anaemia: effect of mitogen and cytokine stimulation. *Br J Haematol.* 2000 Nov;111(2):452-60.
- 9) Villamor N, Marin P, Aymerich R, Arriols R, Rovira M, Bosch F, Vilella R, Rozman C, Vives-Corrons JL: Diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with cytofluorimetric of molecules bound to the membrane by glycosylphosphatidylinositol groups. *Med Clin (Barc).* 1994 Apr 9;102(13):481-4.
- 10) Iwamoto N, Kawaguchi T, Takatsuki K, Natakuma H, Koyama W: Positivity of the sugar-water test in the screening for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 1994 Aug 15;84(4):1349.
- 11) Macejowski JP, Hibbs JR, Anderson S, Katewas P, Young NS: Bone marrow and peripheral blood lymphocyte phenotype in patients with bone marrow failure. *Exp Haematol.* 1994 Oct;22(11):1102-10.
- 12) Yamada S, Yasui K, Shinozaki K, Nagumo H, Kumagai T: Detection of neutrophil-associated immunoglobulin using flow cytometry in autoimmune neutropenia of infancy. *Pediatr int.* 2002 Jun;44(3):269-72.
- 13) Burchardt K, Wysocki H, Furmaniuk J, Prazmowska B: Usefulness of prednisone test in evaluation of bone marrow function. *Acta Haematol Pol.* 1972 Apr-Jun;3(2):147-54.
- 14) Romero-Guzman LT, Lopez-Karpovitch X, Paredes R, Barrales-Ben O, Piedras J: Detection of platelet-associated immunoglobulins by flow cytometry for the diagnosis of immune thrombocytopenia: a prospective study and critical review. *Haematologica.* 2000 Jun;85(6):627-31.
- 15) Poley S, Mempel W: Laboratory diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia: advantages of a functional flow cytometric test in comparison to the heparin-induced platelet-activation test. *Eur J Haematol.* 2001 Apr;66(4):253-62.
- 16) Fabris F, Casonato A, Randi ML, Luzzato G, De Silvestro G, Onagro G, Girolami A: The use of fluorescence flow cytometry in the characterization of Bernard-Soulier syndrome and Glanzmann's thrombasthenia. *Haematologica.* 1989 Jan-Feb;74(1):39-44.
- 17) Del Canizo MC, Fernandez ME, Lopez A, Vidriales B, Villaron E, Ortuno F, Orfao A, San Miguel JF: Immunophenotypic analysis of myelodysplastic syndromes. *Haematologica.* 2003 Apr;88(4):402-7.
- 18) Ogata K, Nakamura K, Yokose N, Tamura H, Tachibana M, Hayashi T, Sakamaki H, Murai I, Tohyama K, Tomoyasu H, Nonaka Y, Mori M, Dan K, Yoshida J: Clinical significance of phenotypic features of blasts in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood.* 2002 Dec 1;100(12):3887-96.
- 19) Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, Marce S, Lopez-Guillermo A, Campo E, Montserrat E: ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2003 May 1; 348(18):1764-75.
- 20) Semple JW, Allen D, Chang W, Castaldi P, Freedman J: Rapid separation of CD4+ and CD19+ lymphocyte population from human peripheral blood by a magnetic activated cell sorting (MACS). *Cytometry.* 1993 Nov;14(8):955-60.

- 21) Fiserova A, Hajek R, Holubova V, Buchler T, Sobotka J, Kovarova P, Musilova R, Bourkova L, Bulikova A, Mareschova I, Janackova Z, Kuglik P, Vorlicek J, Penka M: Detection of 13q abnormalities in multiple myeloma using immunomagnetically selected plasma cells. *Neoplasma*. 2002;49(5):300-6.
- 22) Brons PP, Van Erp PE, Pennings AH: Simultaneous DNA content and cell-surface immunofluorescence analysis. *Methods Cell Biol*. 1994;41:95-102.
- 23) Nowak R, Oelschlaegel U, Schuler U, Zengler H, Hoffmann R, Andreeff M: Sensitivity of combined DNA/immunophenotype flow cytometry for the detection of low levels of aneuploid lymphoblastic cells in bone marrow. *Cytometry*. 1997 Feb 15;30(1):47-53.
- 24) Almeida J, Orfao A, Ocqueteau M, Mateo G, Corral M, Caballero M, Blade J, Moro MJ, Hernandez J, San Miguel JF: High-sensitive immunophenotyping and DNA ploidy studies in the investigation of minimal residual disease in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 1999 Oct;107(1):121-31.
- 25) Bassoe CF: Flow cytometric studies on phagocyte function in bacterial infections. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [C]*. 1984 Jun;92.
- 26) Rothe G, Emmendorffer A, Oser A, Roesler J, Valet G: Flow cytometric measurement of the respiratory burst activity in phagocytes using dihydrorhodamine 123. *J Immunol Methods*. 1991 Apr 8;138(1):133-5.
- 27) Kishimoto TK, Jutila MA, Butcher EC: Identification of a human peripheral lymph node homing receptor: a rapidly down-regulated adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990 Mar;87(6):2244-8.
- 28) Straus SE, Sneller M, Lenardo MJ, Puck JM, Strober W: An inherited disorder of lymphocyte apoptosis: the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Ann Intern Med*. 1999 Apr 6;130(7):591-601.
- 29) Blesing JJ, Brown MR, Novicio C, Guarraia D, Dale JK, Straus SE, Fleisher TA: A composite picture of TCR alpha/beta(+) CD4(-)CD8(-) T Cells (alpha/beta-DNTCs) in human with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Clin Immunol*. 2002 Jul;104(1):21-30.
- 30) Aucouturier P, Lacombe C, Bremard C, Lebranchu Y, Seligmann M, Griscelli C, Preud'Homme JL : Serum IgG subclass levels in patients with primary immunodeficiency syndromes or abnormal susceptibility to infections. *Clin Immunol Immunopathol*. 1989 Apr;51(1):22-37.
- 31) Filatov AV, Shcherbukhin VV, Bachurin PS, Yartsev MN: Two-colour flow cytometry study of lymphocyte subpopulations in patients with primary immunodeficiencies. *Biomed Sci*. 1991;2(1):88-91.
- 32) Groeneweg M, Lankester AC, Bredius RG: From gene to disease: CD40 ligand deficiency as the cause of X-linked hyper-IgM-syndrome. *Ned Tijdschr Geneeskd* 2003 May 24;147(21):1024-8.
- 33) Rosenstein Y, Park JK, Hahn WC, Rosen FS, Bierer BE, Burakoff S: CD43, a molecule defective in Wiscott-Aldrich syndrome, bind to ICAM-1. *Nature*. 1991 Nov 21;354(6350):233-5.
- 34) Futatani T, Miyawaki T, Tsukada S, Hashimoto S, Kunikata T, Kurimoto M, Niida Y, Matsuoka H, Sakiyama Y, Iwata T, Tatsuzawa O, Yoshizaki K, Kishimoto T: Deficient expression of Bruton's tyrosine kinase in monocytes from X-linked agammaglobulinemia as evaluated by a flow cytometric analysis and its clinical application to carrier detection. *Blood*. 1998 Jan 15;91(2):595-602.

35) Pianezze G, Billio A, Morello E, Svaldi M, Gambato R, Langes M, Coser P: A new method for routine flow-cytometric analysis of bone marrow aspirates. Integration of CD45/SS with CD44/SS and CD44/CD45 analysis. Cytometry (submitted).

2.4 – Sintesi dei risultati attesi.

- **Incremento dell'efficacia operativa per l'introduzione di protocolli sperimentali e collaborazione con Centri di secondo livello.** Inserimento dell'unità operativa Ematologica in una rete regionale, con Vicenza e Verona come Centri di riferimento. Collaborazione con Centri di Regioni limitrofe (Udine, Bolzano, Aviano).
- **Riduzione del disagio per gli utenti.** La disponibilità di un Servizio che soddisfi le esigenze dei malati trattabili in loco ed avvii gli altri verso Centri selezionati per il rigore scientifico dei protocolli di terapia, garantirà la cura migliore ad ogni malato dell'ULSS.
- **Allargamento del servizio ai pazienti dell'ULSS n° 2, dopo una fase d'espansione e consolidamento dell'attività.** Si ritiene che il conseguimento di un adeguato livello di specializzazione possa richiamare gli utenti di tutta la Provincia.
- **Riduzione dei costi,** ottenibile grazie al contributo di Associazioni di Volontariato ("Nuovi Traguardi", sezione bellunese dell'AIL) e alla condivisione di risorse fra Reparti e Servizi afferenti al Gruppo Ematologico. La riduzione della degenza ordinaria e l'incremento progressivo dell'attività di Day Hospital contribuiranno all'abbattimento dei costi.
- **Coinvolgimento della società civile e del Volontariato attivo.** L'avvio di un progetto dedicato, non potrà che favorire l'impegno delle Associazioni di Volontariato che operano nel campo dell'Ematologia e ricevere il plauso della pubblica opinione.
- **Diffusione di un clima motivazionale fra gli operatori coinvolti nella realizzazione del progetto,** favorito da percorsi formativi mirati, già avviati per il personale infermieristico.
- **Realizzazione di un modello organizzativo trasversale,** potenzialmente adottabile in altri ambiti specialistici.

2.5 – Struttura e strumentazione disponibili per ciascuno degli Enti partecipanti.

Il progetto generale del Gruppo Ematologico troverà la sua naturale attuazione in seno all'ULSS n° 1. Le strutture cui afferiscono i membri attualmente componenti il Gruppo Ematologico sono:

- **Divisione Medica,** con il prof. Federico Tremolada, la dott.ssa Orietta Fontanive la dott.ssa Lorella Cimarosto.
- **Servizio di Oncologia medica,** con il dott. Mauro Giusto e il dott. Francesco Laveder.
- **Divisione di Pediatria,** con il dott. Paolo Grotto.
- **Servizio di Anatomia Patologica,** con il dott. Claudio Doglioni e la dott.ssa Crocifissa Lo Consulo.
- **Laboratorio analisi,** con il dott. Gianni Bertiato e il dott. Graziano Pianezze.

Per il futuro è auspicata la partecipazione di rappresentanti di altre unità operative: Servizio di Immunoematologia e Trasfusionale, Radiologia diagnostica, Radioterapia, Medicina Nucleare e Geriatria.

La realizzazione del progetto complessivo del Gruppo prevede la disponibilità di 5-6 posti letto dedicati ai malati Ematologici (reparti di Medicina e Oncologia). Almeno una delle stanze di degenza di ciascun reparto dovrà essere munita di apparecchiature per il trattamento dell'aria e la riduzione della carica microbica, per il ricovero di pazienti ad elevato rischio infettivo.

È inoltre previsto l'adeguamento strutturale dei locali adibiti a Day Hospital, finalizzati a garantire funzionalità, sicurezza, accoglienza, confort e rispetto della privacy.

Per quanto riguarda la prima fase del progetto, la struttura in cui troverà attuazione è il Laboratori analisi dell'Ospedale S. Martino.

La strumentazione necessaria per l'applicazione delle metodiche elencate è la seguente:

- Consumabili (provette, pastette, puntali, filtri, ecc): disponibili presso il Laboratorio.
- Vetreria varia: disponibile presso il Laboratorio.
- Pipette automatiche di varie capacità: disponibili presso il Laboratorio.
- Agitatore Vortex: disponibile presso il Laboratorio.
- Centrifughe da banco: disponibili presso il Laboratorio.
- Frigorifero a 4-8 °C: disponibile presso il Laboratorio
- Bagno termostatico: disponibile presso il Laboratorio.
- Termostato ad aria: disponibile presso il Laboratorio.
- Cappa sterile a flusso laminare: disponibile presso il Laboratorio.
- Incubatore a CO₂ per colture cellulari: disponibile presso il Laboratorio.
- Contaglobuli automatico: disponibile presso il Laboratorio.
- Spettrofotometro: disponibile presso il Laboratorio.
- Nefelometro: disponibile presso il Laboratorio
- Apparecchiatura per elettroforesi su gel di poliacrilamide (SDS-PAGE), attualmente non disponibile, previsto l'acquisto con finanziamento dell'Associazione "Nuovi Traguardi".
- Citofluorimetro a quattro fluorescenze: disponibile presso il Laboratorio.

3 - Piano economico finanziario del progetto di ricerca.

I^a TABELLA						
COSTI	I° ANNO	II° ANNO	TOTALE COSTO PROGETTO	COFINANZIAMENTO ENTE PROPONENTE	COFINANZIAMENTO ALTRI ENTI	TOTALE RICHIESTO A FONDAZIONE
Materiale inventariabile	7500	----	7500	7500	----	----
Materiale di consumo	25000	25000	50000	----	50000	----
Personale a contratto	50000	50000	100000	----	----	100000
Collaborazioni	----	----	----	----	----	----
Missioni	----	----	----	----	----	----
Pubblicazioni	----	----	----	----	----	----
Licenze brevetti	----	----	----	----	----	----
Partecipazione convegni	----	----	----	----	----	----
Organizzazione seminari	----	----	----	----	----	----
Altri costi	----	----	----	----	----	----
TOTALE	82500	75000	157500	7500	50000	100000

II^a TABELLA

QUOTE SPESE GENERALI E VALORIZZAZIONI	I° ANNO	II° ANNO	TOTALE	ENTE PROPO- NENTE	ALTRI ENTI	DIFFER- ENZA DA COPRIRE
Quote spese generali ente proponente	500	500	1000	1000	----	----
Quote spese generali altri enti partecipanti	5000	5000	10000	----	10000	----
TOTALE SPESE GENERALI	5500	5500	11000	1000	10000	----
Valorizzazione ente proponente	1000	1000	2000	2000	----	----
Valorizzazione altri enti partecipanti	30000	30000	60000	----	60000	----
TOTALE SPESE GENERALI E VALORIZZAZIONI	36500	36500	73000	3000	70000	----

TABELLA RIEPILOGATIVA

	I° ANNO	II° ANNO	TOTALE COSTO PRO- GETTO	COFINAN- ZIAMENTO ENTE PRO- PONENTE	COFINAN- ZIAMENTO ALTRI ENTI	TOTALE RICHIESTO A FONDA- ZIONE
TOTALE Costi diretti	82500	75000	157500	7500	50000	100000
TOTALE Spese generali e valorizzazioni	36500	36500	73000	3000	70000	----
TOTALE	119000	111500	230500	10500	120000	100000

4 – Dichiarazione di responsabilità.

Si dichiara che la ricerca in oggetto non è svolta, direttamente od indirettamente, in relazione ad alcun rapporto di committenza pubblica o privata o per adempimento di precisi impegni istituzionali.

Si dichiara inoltre che le risorse dell'Associazione "Nuovi Traguardi", disponibili quali cofinanziamento del presente progetto, sono pari a € 7500. La presente dichiarazione costituisce impegno dell'apporto finanziario alla ricerca.

Infine, si rilascia il consenso al trattamento dei dati personali, ai sensi della legge 675/96 (allegato F)

Belluno, 3 ottobre 2003

Il legale rappresentante

dell'Associazione "Nuovi Traguardi"

dott. Donato Manfroi

Il coordinatore
responsabile scientifico della ricerca

dott. Graziano Pianezze