

Протокол клинической апробации

Идентификационный № _____

Дата _____

I. Паспортная часть

1. Название предлагаемого к проведению клинической апробации метода профилактики, диагностики, лечения и реабилитации (далее – метод)

«Клиническая апробация диагностической тест-системы для оценки потенциала патогенности вирусов гриппа и ОРВИ по цитокиновому профилю, прогноза развития тяжелых и осложненных форм инфекции».

2. Наименование и адрес федеральной медицинской организации, разработавшей протокол клинической апробации метода профилактики, диагностики, лечения и реабилитации (далее – протокол клинической апробации)

ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, Санкт-Петербург, ул. профессора Попова, 15/17

3. Фамилия, имя, отчество и должность лиц, уполномоченных от имени федеральной медицинской организации подписывать протокол клинической апробации

Васин Андрей Владимирович –

и.о. директора ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России.

Деева Элла Германовна – заведующая специализированной клиникой ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России

II. Обоснование клинической апробации метода

4. Аннотация метода

Метод направлен на внедрение инновационных подходов диагностики и лечения с целью предотвращения смертности от гриппа и других вирусных инфекций и включает в себя клиническую апробацию тест-системы на основе ПЦР-диагностики для оценки цитокинового профиля.

Для оценки тяжести инфекционного процесса и потенциала патогенности различных штаммов вируса гриппа и вирусов, вызывающих ОРВИ разработана и будет апробирована тест-система для определения ключевых маркеров воспаления с помощью проведения ПЦР в режиме реального времени для определения мРНК цитокинов IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 β , IL-18, IFN- γ , TNF- α и изоформ NO-синтетазы.

Оценка корреляции между респираторными вирусами, штаммами вируса гриппа и тяжестью течения заболевания, выраженностью системной воспалительной реакции позволит разработать стандарты противовоспалительной терапии, что значительно сократит период заболевания, частоту развития осложнений и смертность, в том числе в группах риска.

Данный диагностический подход необходим для выявления и характеристики возникающих пандемически опасных штаммов и определения потенциала их патогенности и развития тяжелых осложненных форм гриппозной инфекции с целью выработки адекватной тактики и схем лечения для предотвращения развития осложнений и смертельных исходов.

5. Актуальность метода для здравоохранения, включая организационные, клинические и экономические аспекты

Основой быстрого прогрессирования и тяжести течения заболевания является развитие «цитокинового шторма», который становится пусковым механизмом развития синдрома системной воспалительной реакции с риском формирования синдрома полиорганной недостаточности (заключительного этапа тяжелых инфекционных процессов), имеющего место при гриппе и ряде других ОРВИ. Избыток продукции цитокинов играет ключевую роль в развитии системного поражения органов и летальном исходе заболевания. Для оценки тяжести инфекционного процесса и потенциала патогенности различных штаммов вируса гриппа и вирусов, вызывающих ОРВИ будут проведены исследования по оценке цитокинового профиля и апробирована тест-система для определения ключевых маркеров воспаления с помощью проведения ПЦР в режиме реального времени для определения мРНК цитокинов IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 β , IL-18, IFN- γ , TNF- α и изоформ NO-синтетазы.

Полученные данные об этиологическом агенте будут сопоставлены с данными клинического исследования и характеристикой цитокинового профиля для оценки потенциала патогенности вирусов гриппа и ОРВИ, частоты развития осложнений и тяжелого течения инфекции. Оценка корреляции между этиологическим агентом, тяжестью течения заболевания и выраженностью системной воспалительной реакции необходима для разработки стандартов целевой противовоспалительной терапии гриппа и ОРВИ.

Область применения тест-системы – клиническая лабораторная диагностика вирусных инфекций, в том числе для оценки потенциала патогенности вирусов и прогнозирования тяжести инфекционного процесса и выработки адекватной целевой терапии.

Измерение уровня цитокинов у пациентов с гриппом и другими ОРВИ необходимо для своевременного прогнозирования течения и исхода заболевания, в том числе предупреждения развития потенциально летальной реакции гиперцитокинемии. Предложенные методы для определения цитокинового статуса могут быть использованы при разработке и испытаниях противогриппозных вакцин с целью оценки их безопасности и эффективности при формировании специфического гуморального и клеточного иммунитета. Кроме того, разработанные системы применимы для анализа экспрессии цитокинов не только при гриппе и ОРВИ, но и при проведении широкого круга биологических и медицинских исследований. Лабораторные тест-системы мультиплексной ПЦР для оценки цитокинового профиля могут быть внедрены в производство и медицинскую практику.

6. Новизна метода и (или) отличие его от известных аналогичных методов

Тест-система для точной количественной оценки мРНК IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 β , IL-18, IFN- γ , TNF- α и изоформ NO-синтазы человека в клетках разработана на основе мультиплексной ПЦР в режиме реального времени. Данная система позволяет проводить мультиплексный анализ мРНК цитокинов и NO-синтазы с чувствительностью от 20 фМ, что соответствует современным требованиям, предъявляемым к такого рода системам. Разработанный метод в мультиплексном исполнении не имеет прямых коммерческих аналогов.

Впервые в мировой практике будут разработаны стандарты противовоспалительной терапии гриппа и ОРВИ.

7. Краткое описание и частота известных и потенциальных рисков применения метода для пациента, если таковые имеются, и прогнозируемых осложнений

Процедуры, выполняемые в рамках данного протокола, являются рутинными (забор крови, забор мазков из носа) в клинической практике;

частота их выполнения не создает значительных рисков для пациента-участника исследования.

8. Ссылки на литературные источники публикаций результатов научных исследований метода или отдельных его составляющих (в том числе собственных публикаций) в рецензируемых научных журналах и изданиях, в том числе в зарубежных журналах (названия журналов/изданий, их импакт-фактор)

1. Плотникова М.А., Васин А.В., Клотченко С.А., Смирнова Т.Д., Даниленко Д.М., Егоров В.В., Шурыгина А.-П.С., Киселев О.И. Сравнение паттерна экспрессии мРНК цитокинов в эпителиальных клетках А-549, инфицированных вирусами гриппа. Цитокины и Воспаление. 2013. Т. 12. № 1-2. С.57–65. Импакт-фактор 0.506 (2012 г.).

2. Плотникова М.А., Клотченко С.А., Егоров В.В., Никуленков К.П., Васин А.В., Киселев О.И. Применение твердофазного иммуноферментного анализа в формате микрочипа для количественного определения уровня цитокинов. Медицинская иммунология. 2012. Т. 14, № 4-5. С. 415-418. Импакт-фактор: 0,484 (2014, двухлетний).

3. Klotchenko S.A., Vasin A.V., Sandybaev N.T., Plotnikova M.A., Chervyakova O.V., Smirnova E.A., Kushnareva E.V., Strochkov V.M., Taylakova E.T., Egorov V.V., Koshemetov J.K., Kiselev O.I., Sansyzbay A.R.. Oligonucleotide microarray for subtyping of influenza A viruses . Journal of Physics: Conference Series. 2012. V. 345. doi:10.1088/1742-6596/345/1/012041. IF 2.26

4. Плотникова М.А., Васин А.В., Марочкина Е.Ю., Клотченко С.А., Романовская-Романько Е.А., Шурыгина А.-П.С., Егоров В.В., Киселев О.И. Олигонуклеотидный биочип для определения профиля экспрессии генов цитокинов человека. Цитокины и Воспаление. 2011. Т. 10. № 2. С. 5–9. Импакт-фактор: 0.506 (2012 г.)

5. Vasin A.V., Sandybaev N.T., Plotnikova M.A., Klotchenko S.A., Chervyakova O. V., Strochkov V.M., Taylakova E.T., Elpaeva E.A., Komissarov A.B., Egorov V.V., Koshemetov J.K., Kiselev O.I., Mamadaliev S.M.. Multisegment one-step RT-PCR fluorescent labeling of influenza A virus genome for use in diagnostic microarray applications. Journal of Physics: Conference Series. 2011. V. 291. doi:10.1088/1742-6596/291/1/012006. IF 2.26

9. Иные сведения, связанные с разработкой метода

Проведенные предварительные доклинические исследования по определению цитокинового профиля с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени показали высокие чувствительность и воспроизводимость данного метода исследования.

III. Цели и задачи клинической апробации

10. Детальное описание целей и задач клинической апробации

Целью клинической апробации является оценка корреляции между этиологическим агентом, вызвавшим заболевание, тяжестью течения заболевания и выраженностью системной воспалительной реакции, на основе идентификации мРНК цитокинов.

Задачи:

1. Провести клиническую апробацию подходов и тест-системы для определения ключевых маркеров воспаления с помощью проведения ПЦР в режиме реального времени для определения мРНК цитокинов IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 β , IL-18, IFN- γ , TNF- α и изоформ NO-синтетазы;
2. Оценить потенциал патогенности вирусов гриппа и ОРВИ на основе характеристики цитокинового профиля;
3. Оценить корреляцию между этиологическим агентом, вызвавшим заболевание, тяжестью течения заболевания и выраженностью системной воспалительной реакции, на основе идентификации мРНК цитокинов;
4. Разработать систему прогностических факторов развития тяжелых форм инфекции;
5. Разработать рекомендации по диагностике «цитокинового» шторма и воспалительной реакции у больных гриппом и ОРВИ.

IV. Дизайн клинической апробации

11. Научная обоснованность и достоверность полученных на стадии разработки метода данных, включая доказательство его безопасности

В ходе доклинических исследований был проведен анализ клинических образцов для определения цитокинового профиля с помощью ПЦР в режиме реального времени для определения мРНК цитокинов IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 β , IL-18, IFN- γ , TNF- α и изоформ NO-синтетазы.

Клинические образцы являлись анонимными, не содержащими информацию о пациенте, от которого были получены.

В ходе проведения доклинических испытаний опытная тест-система соответствовала назначению и требованиям лабораторной практики.

Диагностические характеристики тест-системы составляли - нижний предел чувствительности разрабатываемого метода в среднем составил менее чем 20 фМ для очищенных ПЦР фрагментов, эффективность амплификации составила 90–100%, воспроизводимость результатов при количественной детекции мРНК цитокинов составила не менее 98%.

12. Описание дизайна клинической апробации должно включать в себя:

12.1. Указание основных и дополнительных (при наличии) исследуемых параметров, которые будут оцениваться в ходе клинической апробации

- корреляция между тяжестью течения инфекции и данными цитокинового профиля (продолжительность заболевания, динамика исчезновения симптомов интоксикации и катаральных симптомов, частота развития осложнений);
- корреляции между этиологическим агентом и выраженностью системной воспалительной реакции, на основе идентификации мРНК цитокинов;
- корреляция между этиологическим агентом и тяжестью течения заболевания;

12.2. Описание дизайна клинической апробации с графической схемой (этапы и процедуры, а также сроки и условия их проведения, иное)

Клиническое исследование будет проведено в периоды эпидемического подъема заболеваемости острыми респираторными вирусными инфекциями 2016-2017 гг. Сроки предоставления отчета – 1 месяц после завершения клинической апробации.

В исследование планируется включить 103 пациента (63 пациента – в 2016 г., 40 пациентов – в 2017 г.) с диагнозом ОРВИ/грипп, в возрасте от 18 до 65 лет, соответствующих критериям включения и подписавших Информированное согласие на участие в данном исследовании. В исследование могут быть включены пациенты, находящиеся на амбулаторном лечении, при необходимости исследование может проводиться стационарно.

Все процедуры исследования могут выполняться как в медицинском центре, так и на дому у пациента, в зависимости от состояния здоровья последнего.

Исследование будет включать следующие этапы: скрининг, период лечения, период наблюдения (рисунок 1).

Общая длительность исследования для каждого пациента составит 8 ± 1 день.

Период скрининга составляет 4 ± 1 часа.

Период лечения составляет $5 + 1$ день.

Период наблюдения составляет 3 ± 1 дня.

Запланировано проведение основных 4 визитов -

Визит V1 (1ый день) включает - процедуру скрининга, включение пациента в исследование, сбор анамнеза, клинический осмотр, назначение терапии, проведение лабораторных исследований.

Визит V2 (3ий+1 день от начала заболевания) включает - клинический осмотр, забор крови для ПЦР-диагностики - определение цитокинового профиля.

Визит V3 (5+1 день от начала исследования) включает в себя клинический осмотр, решение о завершении (продолжении) терапии.

Визит V4 (8 ± 1 день исследования) включает - клинический осмотр,

проведение лабораторных исследований, забор крови для ПЦР-диагностики - определение цитокинового профиля.

Также, во время исследования могут проводиться дополнительные визиты по показаниям и опрос по телефону, о чем делаются записи в индивидуальной регистрационной карте (ИРК).

При нахождении пациента в клинике врачебный осмотр и проводится ежедневно с записью в первичной медицинской документации.

Рисунок 1. Дизайн исследования



12.3. Описание метода, инструкции по его проведению

Тест-система для определения ключевых маркеров воспаления проводится с помощью ПЦР (полимеразная цепная реакция) в режиме реального времени, и включает определение мРНК цитокинов IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 β , IL-18, IFN- γ , TNF- α и изоформ NO-синтетазы. Данный метод диагностики предназначен для оценки тяжести инфекционного процесса и потенциала патогенности различных штаммов вируса гриппа.

Мультиплексная ПЦР с детекцией в режиме реального времени проводится в 30 мкл реакционной смеси, содержащей 1-кратный Taq-буфер, 4 мМ MgCl₂, 5 единиц Taq-полимеразы, эквимольную смесь четырёх dNTP по 330 мкМ каждого, 2–5 мкл кДНК, смесь специфических прямых и обратных праймеров и олигонуклеотидных TaqMan зондов.

Количественное соотношение праймеров и олигонуклеотидных TaqMan зондов в реакционных смесях составляет –

SET1 содержит по 0,7 мкМ праймеров и 0,47 мкМ зонда к GAPDH; по 0,4 мкМ праймеров и 0,27 мкМ зонда к IL-1 β ; по 0,15 мкМ праймеров и 0,1 мкМ зонда к IL-12 β ; по 0,85 мкМ праймеров и 0,57 мкМ зонда к IFN- γ .

SET2 содержал по 0,65 мкМ праймеров и 0,43 мкМ зонда к GAPDH; по 0,15 мкМ праймеров и 0,1 мкМ зонда к IL-10; по 0,15 мкМ праймеров и 0,1 мкМ зонда к IL-4; по 0,4 мкМ праймеров и 0,27 мкМ зонда к TNF.

SET3 содержал по 0,7 мкМ праймеров и 0,47 мкМ зонда к GAPDH; по 0,15 мкМ праймеров и 0,1 мкМ зонда к IL-6; по 0,6 мкМ праймеров и 0,4 мкМ зонда к IL-18; по 0,15 мкМ праймеров и 0,1 мкМ зонда к IL-2.

мПЦР проводили в амплификаторе CFX96 по следующей программе: 95 °С – 4 мин; затем 5 циклов: 95 °С – 30 с; 57 °С – 30 с, 72 °С – 60 с; затем 35 циклов: 95 °С – 30 с; 57 °С – 30 с, 72 °С – 60 с с детекцией по четырём каналам: FAM, HEX, ROX и Cy5.

Графическая схема подготовки и проведения исследования ПЦР-диагностики представлена на рисунке 2.



Рисунок 2. Схема процедуры подготовки и проведения ПЦР-исследования для определения мРНК цитокинов.

12.4. Ожидаемая продолжительность участия пациентов в клинической апробации, описание последовательности и продолжительности всех периодов клинической апробации, включая период последующего наблюдения, если таковой предусмотрен

Общая длительность исследования для каждого пациента составит 8±1 дней (средняя длительность лечения неосложненной легкой и среднетяжелой форм ОРВИ составляет 5-8 дней).

Исследование будет включать следующие этапы: скрининг, период лечения, период наблюдения (таблица 1).

Период скрининга составляет 4±1 час.

Период лечения составляет 5 +1 день.

Период наблюдения составляет 3 +1 дня.

Запланировано проведение основных 4 визитов -

Визит V1 (1ый день) включает - процедуру скрининга, включение пациента в исследование, сбор анамнеза, клинический осмотр, назначение терапии, проведение лабораторных исследований.

Визит V2 (3ий+1 день от начала заболевания) включает - клинический осмотр, забор крови для ПЦР-диагностики - определение цитокинового профиля.

Визит V3 (5+1 день от начала исследования) включает в себя клинический осмотр, решение о завершении (продолжении) терапии.

Визит V4 (8±1 день исследования) включает - клинический осмотр, проведение лабораторных исследований, забор крови для ПЦР-диагностики - определение цитокинового профиля.

Также, во время исследования могут проводиться дополнительные визиты, о чем делаются записи в индивидуальной регистрационной карте (ИРК).

Визит V1 (1ый день). В период скрининга после подписания Информационного листка пациентом на участие в клиническом исследовании врач-исследователь определяет соответствие пациента критериям включения, после чего производится включение пациента в исследование. На визите V1 проводится сбор демографических данных (пол, возраст), подробного медицинского анамнеза (включая анамнез со стороны дыхательной, сердечно-сосудистой, пищеварительной, мочевыделительной систем и аллергологический анамнез для выделения групп риска), анамнеза заболевания, врачебный осмотр с определением жизненно-важных показателей, регистрация жалоб пациента, забор мазков из носовых ходов для идентификации возбудителя методом ПЦР, лабораторные исследования (биохимический анализ крови, клинический анализ крови), тест на беременность (для женщин репродуктивного возраста). На данном визите врач-исследователь назначает терапию согласно стандартам оказания медицинской помощи при данном заболевании.

Визит V2 (3ый (+1 день) день от начала заболевания). На данном визите проводится регистрация жалоб, врачебный осмотр с определением жизненно-важных показателей и забор крови для определения мРНК цитокинов методом ПЦР.

Визит V3 (5ый (+1 день) день от начала исследования). На данном визите проводится регистрация жалоб, врачебный осмотр с определением жизненно-важных показателей и принимается решение о завершении (продолжении) лечения.

Визит V4 (8±1 день от начала исследования). На данном визите проводится врачебный осмотр с определением жизненно-важных показателей, регистрация жалоб пациента, лабораторные исследования

(биохимический анализ крови, клинический анализ крови), забор крови для определения мРНК цитокинов методом ПЦР.

Таблица 1. План – график проведения ключевых мероприятий (с внесением данных в ИРК)

Параметры	Период лечения					Период наблюдения		
	Скрининг (4 ± 1 часа)							
Дни	1	4	5+1	6	7	8 ± 1		
Визиты/Процедуры	V1	V2 (3ий (+1) день от начала заболевания)			V3	V4		
Получение ИС	X							
Сбор анамнеза	X							
Анализ критериев включения/исключени я	X							
Тест на беременность	X							
Регистрация жалоб пациента	X	X			X			X
Верификация диагноза – ПЦР- диагностика	X							
Лечение	X	X	X	X	X			
Проведение ПЦР- диагностики на цитокины		X						X
Клиническое обследование (врачебный осмотр и регистрация жизненно-важных показателей)	X	X			X			X
Общий анализ крови	X							X
Биохимический анализ крови	X							X
ЭКГ, Rg, УЗИ	По показаниям	По показаниям						
Консультации врачей- специалистов (ЛОР, кардиолог, и др.)	По показаниям	По показаниям						
Заключительная оценка								X

Во время всего периода исследования будут проводиться инструментальные исследования - измерения АД, ЧСС, термометрия, а также по показаниям - ЭКГ, Rg-диагностика, УЗИ-диагностика и консультации врачей специалистов (ЛОР, кардиолог, иммунолог и др) по назначению врача-исследователя.

Во время всего периода лечения пациенты будут получать стандартную противовирусную и симптоматическую терапию в соответствии со стандартами оказания медицинской помощи при гриппе и ОРВИ.

Врачебный осмотр включает в себя оценку общего состояния пациента, состояния кожных покровов, исследование лимфатических узлов, верхних дыхательных путей и легких, сердца, а также оценку таких параметров как, температура тела в подмышечной впадине, систолическое и диастолическое артериальное давление, частота сердечных сокращений, частота дыхания.

При нахождении пациента в клинике врачебный осмотр проводится ежедневно с записью в первичной медицинской документации.

Лабораторные исследования включают в себя оценку следующих показателей:

Забор мазков из носовых ходов для проведения ПЦР-диагностики для идентификации возбудителя проводится на визите V1.

Забор крови для проведения ПЦР в режиме реального времени для определения мРНК цитокинов проводится на визитах V2, и V4.

Общий анализ крови (проводится на визитах V1, V4): количество эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, СОЭ, лейкоцитарная формула, проводится согласно утвержденной методике локальной лаборатории клинического центра;

Биохимический анализ крови (проводится на визитах V1, V4): креатинин, мочевины, АСТ, АЛТ, щелочная фосфатаза, проводится согласно утвержденной методике локальной лаборатории клинического центра. Пробы крови для этих исследования забираются всем пациентам согласно стандартной практике клинического центра;

Инструментальные обследования: электрокардиография, рентгенография органов грудной клетки и/или околоносовых пазух, УЗИ-диагностика будут проводиться пациентам по показаниям и назначению врача-исследователя (при подозрении на развитие осложнений).

Консультации врачей-специалистов: (лор, пульмонолог, кардиолог и др.) будет проводиться по показаниям и назначению врача-исследователя.

Результаты каждого лабораторного исследования должны быть датированы и подписаны врачом-исследователем.

12.5. Перечень данных, регистрируемых непосредственно в индивидуальной регистрационной карте клинической апробации метода (т.е. без записи в медицинской документации пациента) и рассматриваемых в качестве параметров, указанных в пункте 12.1 настоящего протокола клинической апробации

В индивидуальной регистрационной карте пациента будут регистрироваться критерии включения и критерии исключения пациентов (без записи в первичной медицинской документации пациента), а именно:

Критерии включения пациентов - Мужчины и женщины в возрасте от 18

до 65 лет; Установленный врачом диагноз – ОРВИ, в том числе грипп с клинической симптоматикой - температура тела выше 37,5°C, и как минимум, одно из проявлений синдрома интоксикации (головная боль/миалгии/боли в глазных яблоках) или катарального синдрома (боли в горле/кашель/насморк); Длительность заболевания до включения в исследование не более 48 часов; Отсутствие осложнений основного заболевания на момент включения в исследование; Наличие подписанного письменного информированного согласия пациента на участие в исследовании; Отрицательный тест на беременность у женщин детородного возраста; Способность пациента к адекватному сотрудничеству.

Критерии невключения пациентов - Мужчины и женщины в возрасте до 18 и старше 65 лет; Осложненное течение заболевания; Беременность, лактация; Пациенты, нуждающиеся, по мнению исследователя, на момент включения в исследование в назначении антибактериальных препаратов; Любые заболевания или состояния, которые, по мнению врача-исследователя, могут исказить результаты исследования и ограничивать участие пациента в исследовании; Отсутствие готовности к сотрудничеству со стороны пациента.

Также, в перечень данных, регистрируемых в ИРК, входят следующие данные - общая продолжительность заболевания ОРВИ/гриппом, продолжительность основных симптомов ОРВИ/гриппа, наличие/отсутствие осложнений основного заболевания.

V. Отбор и исключение пациентов, которым оказывается медицинская помощь в рамках клинической апробации

В качестве кандидатов для участия в исследовании будут рассматриваться больные с диагнозом ОРВИ/грипп, имеющие направление в исследовательский центр и прошедшие отборочную врачебную комиссию Института.

Пациенты, участвующие в клиническом исследовании, в соответствии с Хельсинкской декларацией имеют право прекратить свое участие в исследовании в любое время и по любой причине.

Причина каждого досрочного завершения исследования должна быть отмечена в Индивидуальной регистрационной карте (ИРК) пациента.

13. Критерии включения пациентов

- Мужчины и женщины в возрасте от 18 до 65 лет;
- Установленный врачом диагноз – ОРВИ, в том числе грипп, с клинической симптоматикой - температура тела выше 37,5°C, и как минимум, одно из

проявлений синдрома интоксикации (головная боль/миалгии/боли в глазных яблоках) или катарального синдрома (боли в горле/кашель/насморк);

- Длительность заболевания до включения в исследование не более 48 часов;
- Отсутствие осложнений основного заболевания на момент включения в исследование;
- Наличие подписанного письменного информированного согласия пациента на участие в исследовании;
- Отрицательный тест на беременность у женщин детородного возраста;
- Способность пациента к адекватному сотрудничеству;

14. Критерии невключения пациентов

- Мужчины и женщины в возрасте до 18 и старше 65 лет;
- Осложненное течение заболевания;
- Беременность, лактация;
- Пациенты, нуждающиеся, по мнению исследователя, на момент включения в исследование в назначении антибактериальных препаратов;
- Любые заболевания или состояния, которые, по мнению врача-исследователя, могут исказить результаты исследования и ограничивать участие пациента в исследовании;
- Отсутствие готовности к сотрудничеству со стороны пациента.

15. Критерии исключения пациентов из клинической апробации (т.е. основания прекращения применения апробируемого метода)

Пациент должен быть выведен из исследования при возникновении любой из следующих ситуаций:

- отказ от участия в исследовании и отзыв письменного информированного согласия
- выявление в процессе исследования несоответствия критериям включения/невключения
- нарушение пациентом процедур Протокола исследования и/или режима лечебного учреждения.

Для пациентов, которые досрочно исключены из исследования, не будет осуществляться замена. Все полученные в ходе исследования данные для этих пациентов учитываются в конце исследования. Развитие всех нежелательных реакций, наблюдавшихся на момент выбывания пациента из исследования, необходимо отслеживать до их разрешения.

Причина каждого досрочного завершения исследования должна быть отмечена в Индивидуальной регистрационной карте (ИРК) пациента в разделе «Завершение исследования».

Исследование может быть завершено преждевременно:

- в случае наступления обстоятельств, расцениваемых как «форс-мажор»
- по требованию федеральных регуляторных инстанций.

VI. Медицинская помощь в рамках клинической апробации

16. Вид, форма и условия оказания медицинской помощи

Вид – медицинская помощь в рамках клинической апробации.

Форма – медицинская помощь по показаниям

Условия - Стационарная и/или амбулаторная медицинская помощь.

17. Перечень медицинских услуг (медицинских вмешательств)

Оказание медицинских услуг медицинскими работниками в соответствии со стандартами оказания медицинской помощи при гриппе и ОРВИ в стационарных (амбулаторных) условиях:

- прием (осмотр, консультация) врача-специалиста;
- лабораторные методы исследования;
- инструментальные методы исследования.

18. Наименование медицинских изделий, в том числе имплантируемых в организм человека - тест-система для определения ключевых маркеров воспаления с помощью проведения ПЦР в режиме реального времени для определения мРНК цитокинов IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 β , IL-18, IFN- γ , TNF- α и изоформ NO-синтетазы.

Забор материалов (кровь) для определения уровня мРНК цитокинов с помощью ПЦР будет производиться на 3+1 день от начала заболевания (пик выработки цитокинов у больных гриппом и ОРВИ) и 8 \pm 1 день (контроль).

Также могут быть использованы следующие медицинские изделия – шприц медицинский инъекционный однократного применения, бинт марлевый, салфетка стерильная, бинт эластичный иммобилизирующий, перчатки хирургические однократного применения, система (устройство) для внутривенных вливаний и др.

лекарственные препараты для медицинского применения, дозировка, частота приема, способ введения, а также продолжительность приема, включая периоды последующего наблюдения – использование лекарственных препаратов в соответствии со стандартом оказания медицинской помощи при гриппе и ОРВИ (приложение 1)

перечень используемых биологических материалов
нет

VII. Оценка эффективности метода

В декабре 2017 года будет представлен заключительный отчет, содержащий анализ эффективности разрабатываемого метода.

19. Перечень параметров эффективности

- Оценка корреляции между уровнем мРНК цитокинов и тяжестью течения заболевания.
- Оценка диагностической чувствительности метода определения уровней мРНК цитокинов;

20. Перечень критериев дополнительной ценности

- корреляции между этиологическим агентом и выраженностью системной воспалительной реакции, на основе идентификации мРНК цитокинов;
- корреляция между этиологическим агентом и тяжестью течения заболевания;

21. Методы и сроки оценки, регистрации, учета и анализа параметров эффективности

Тяжесть течения заболевания будет оценена по следующим параметрам:

- Общая продолжительность заболевания ОРВИ/гриппом;
- Продолжительность и выраженность основных симптомов ОРВИ/гриппа (температура выше 37,0⁰С, кашель, боль/першение в горле, заложенность носа/насморк, боль/ломота в мышцах)

1. Общая продолжительность заболевания ОРВИ/гриппом будет оцениваться в часах на основе субъективных жалоб пациента и объективного заключения врача-исследователя. У пациента должно быть зарегистрировано полное стойкое отсутствие симптомов заболевания (0 баллов по всем шкалам в течение не менее 24 часов). Допускается сохранение незначительно выраженных остаточных явлений заболевания (1 балл по одной или нескольким из следующих шкал: «кашель», «заложенность носа/насморк»). У пациента по данным опроса и физикального осмотра, выполненного врачом-исследователем, не должно быть признаков ОРВИ, его осложнений, температура тела не должна быть выше 37,0° С.

2. Продолжительность и выраженность основных симптомов ОРВИ/гриппа будет регистрироваться, основываясь на жалобах пациента. Выраженность симптомов будет оцениваться по четырёх-балльной шкале (от 0 до 3), продолжительность будет оцениваться в часах с момента начала терапии.

Симптом	Отсутствие симптома	Слабое проявление	Умеренное проявление	Сильное проявление
Кашель	0	1	2	3
Боль/першение в горле	0	1	2	3
Заложенность носа/насморк	0	1	2	3
Боль/ломота в мышцах	0	1	2	3
Температура выше 37,0 ⁰ С	0	1	2	3

Забор материалов (кровь) для определения уровня мРНК цитокинов методом ПЦР будет производиться на 3(+1) день от начала заболевания (пик выработки цитокинов у больных гриппом и ОРВИ) и 8(±1) день (контроль).

Результаты исследования вносятся в первичную медицинскую документацию больного и индивидуальную регистрационную карту.

По окончании исследования, на основании результатов (данных), полученных в каждом исследовательском центре, составляется итоговый отчет.

VIII. Статистика

22. Описание статистических методов, которые предполагается использовать на промежуточных этапах анализа результатов клинической апробации и при ее окончании. Уровень значимости применяемых статистических методов

Статистическая обработка результатов будет проводиться с помощью программного пакета IBM SPSS Statistics версии 21. Результаты будут представлены в соответствующем разделе отчета в виде текста и таблиц.

Количественные данные будут описаны при помощи минимальных и максимальных значений, среднего, стандартного отклонения, 95-% доверительного интервала, медианы и квартилей.

Категориальные данные будут описаны при помощи процентных соотношений и абсолютных значений.

Для анализа зависимостей между этиологическим агентом, вызвавшим заболевание, тяжестью течения заболевания и воспалительной реакции будут использоваться коэффициенты ранговой корреляции Кендалла, коэффициенты

Крамера и Лямбда. Тяжесть заболевания будет оцениваться по тяжести симптомов, выраженной в балльной шкале, и длительности разрешения симптомов.

В качестве дополнительного анализа будет проведена оценка клинико-лабораторных показателей внутри групп, разделенных по этиологическому агенту, вызвавшему заболевание, с помощью парного критерия Стьюдента или критерия Вилкоксона и между группами с помощью дисперсионного анализа или критерия Краскелла-Уоллиса, в зависимости от характера распределения данных. Проверка на нормальность распределения будет проведена с помощью критерия Колмогорова-Смирнова.

При наличии выбывших пациентов, в анализ будут включаться пациенты, у которых был произведен забор крови для ПЦР-диагностики (т.е. выбывшие после визита V2).

Анализ лабораторных и клинических данных будет осуществляться в сравнении с исходными и нормативными значениями.

23. Планируемое количество пациентов, которым будет оказана медицинская помощь в рамках клинической апробации с целью оценки эффективности апробируемого метода.

В исследовании будет принят уровень значимости 5% и мощность используемых критериев 90%. Предполагается, что клинически значимая взаимосвязь уровней цитокинов и тяжести заболевания соответствует коэффициентам корреляции, которые определяют связь между исследуемыми переменными как среднюю и выше, то есть не менее 0,30.

Для обеспечения достаточной статистической мощности при вышеуказанных параметрах при предположении, что 10% участников могут покинуть исследование, необходимо включить в исследование 103 пациента с диагнозом ОРВИ/грипп.

24. Описание применяемого метода расчета объемов финансовых затрат

Нормативные затраты на оказание медицинской помощи в рамках клинической апробации определяются на основе базового норматива затрат на оказание медицинской помощи в рамках клинической апробации для пациентов с диагнозом ОРВИ/грипп. Также нормативы учитывают фактические расходы на проведение молекулярно-биологического метода исследования, апробируемого в рамках проведения клинической апробации.

Базовый норматив затрат на оказание медицинской помощи в рамках клинической апробации состоит из базового норматива затрат, непосредственно связанных с оказанием медицинской помощи в рамках клинической апробации и базового норматива затрат на общехозяйственные нужды на оказание медицинской помощи в рамках клинической апробации.

В базовый норматив затрат, непосредственно связанных с оказанием медицинской помощи в рамках клинической апробации включаются:

- затраты на приобретение материальных запасов, потребляемых (используемых) в процессе оказания медицинской помощи в рамках клинической апробации с учетом срока полезного использования;
- иные затраты, непосредственно связанные с оказанием медицинской помощи в рамках клинической апробации;
- затраты на оплату труда с начислениями на выплаты по оплате труда работников, непосредственно связанных с оказанием медицинской помощи в рамках клинической апробации, включая страховые взносы в Пенсионный фонд Российской Федерации, Фонд социального страхования Российской Федерации и Федеральный фонд обязательного медицинского страхования, страховые взносы на обязательное социальное страхование от несчастных случаев на производстве и профессиональных заболеваний, в соответствии с трудовым законодательством и иными нормативными правовыми актами, содержащими нормы трудового права (далее - начисления на выплаты по оплате труда);

Предварительный расчет объемов финансовых затрат на оказание медицинской помощи в рамках клинической апробации 1 пациенту

№ п/п	Наименование расходов	Сумма, руб.
1.	Затраты на оплату труда с начислениями на выплаты по оплате труда работников, непосредственно связанных с оказанием медицинской помощи по протоколу клинической апробации	23 950
2.	Затраты на приобретение материальных запасов (лекарственных препаратов, медицинского инструментария, реактивов, химикатов, мягкого инвентаря, прочих расходных материалов)	20 239
3.	Иные затраты, непосредственно связанные с реализацией протокола клинической апробации	12 211
4.	Затраты на общехозяйственные нужды (коммунальные услуги и работы, работы по содержанию имущества, транспорт, связь, оплата труда с начислениями на выплаты по оплате труда работников, которые не принимают непосредственного участия в реализации протокола клинической апробации)	11 900
4.1	Из них расходы на оплату труда с начислениями на выплаты по оплате труда работников, которые не принимают непосредственного участия в реализации протокола клинической апробации	8 330
	ИТОГО:	68 300

Расчеты сделаны на основании разработанного проекта стандарта оказания медицинской помощи в рамках клинической апробации изложенного в приложении 1 данного протокола.

Общая стоимость метода в одном случае составит 68,3 тыс рублей. Планируемое количество случаев апробации 103 (63 пациента – в 2016 году, 40 пациентов – в 2017 году), общая стоимость апробации составит 7 034,9 тыс. рублей.

Приложение: 1. Проект медико-экономического стандарта оказания медицинской помощи в рамках клинической апробации.

И.о. директора ФГБУ «НИИ Гриппа»
Минздрава России,



А.В. Васин

/А.В.Васин/

Дата _____

Приложение: 1. Проект медико-экономического стандарта оказания медицинской помощи в рамках клинической апробации.

**Проект стандарта
оказания медицинской помощи в рамках клинической апробации**

«Клиническая апробация диагностической тест-системы для оценки потенциала патогенности вирусов гриппа и ОРВИ по цитокиновому профилю, прогноза развития тяжелых и осложненных форм инфекции».

1. Модель пациента (вид медицинской помощи: специализированная медицинская помощь)

Фаза	Острая
Стадия	Средней степени тяжести
Осложнение	Без осложнений
Вид медицинской помощи	Специализированная медицинская помощь
Продолжительность лечения	8±1 дней

2. Требования к диагностике

2.1 Медицинские мероприятия для диагностики заболевания, состояния

Прием (осмотр, консультация) врача-специалиста			
Код медицинской услуги	Наименование медицинской услуги	Усредненный показатель частоты предоставления	Усредненный показатель кратности применения
V01.014.001	Прием (осмотр, консультация) врача-инфекциониста первичный	1	2
V01.015.001	Прием (осмотр, консультация) врача-кардиолога первичный	0,2	1
V01.023.001	Прием (осмотр, консультация) врача-невролога первичный	0,2	1
V01.028.001	Прием (осмотр, консультация) врача-оториноларинголога первичный	0,2	1
A01.31.001	Сбор анамнеза и жалоб при инфекционном заболевании	1	1
A01.31.002	Визуальное исследование при инфекционном заболевании	1	1
A01.31.011	Пальпация общетерапевтическая	1	1
A01.31.012	Аускультация общетерапевтическая	1	1
A02.06.001	Измерение объема лимфоузлов	1	1
A01.31.016	Перкуссия общетерапевтическая	1	1
A02.09.001	Измерение частоты дыхания	1	1
A02.12.001	Исследование пульса	1	1

A02.12.002	Измерение артериального давления на периферических артериях	1	1
A02.31.001	Термометрия общая	1	1

Лабораторные методы исследования			
Код медицинской услуги	Наименование медицинской услуги	Усредненный показатель частоты предоставления	Усредненный показатель кратности применения
	Молекулярно-биологическое исследование на вирусы респираторных инфекций		1
V03.016.003	Общий (клинический) анализ крови	1	1
V03.016.004	Анализ крови биохимический	1	1
V03.016.006	Анализ мочи общий	1	1

Инструментальные методы исследования - дополнительные			
Код медицинской услуги	Наименование медицинской услуги	Усредненный показатель частоты предоставления	Усредненный показатель кратности применения
A05.10.006	Регистрация электрокардиограммы	1	1
A06.08.003	Рентгенография придаточных пазух носа	0,3	1
A06.09.007	Рентгенография легких	1	1

2.2 Медицинские услуги для лечения заболевания, состояния и контроля за лечением

Прием (осмотр, консультация) врача-специалиста			
Код медицинской услуги	Наименование медицинской услуги	Усредненный показатель частоты предоставления	Усредненный показатель кратности применения
V01.014.003	Ежедневный осмотр врачом-инфекционистом с наблюдением и уходом среднего и младшего медицинского персонала в отделении стационара	1	8
V01.023.002	Прием (осмотр, консультация) врача-невролога повторный	0,1	2
V01.028.002	Прием (осмотр, консультация) врача-оториноларинголога повторный	0,1	2
V01.015.001	Прием (осмотр, консультация) врача-кардиолога первичный	0,2	2
V01.023.001	Прием (осмотр, консультация) врача-невролога первичный	0,2	1
V01.028.001	Прием (осмотр, консультация) врача-	0,2	1

	оториноларинголога первичный		
V01.029.001	Прием (осмотр, консультация) врача-офтальмолога первичный	0,2	1

Лабораторные методы исследования			
Код медицинской услуги	Наименование медицинской услуги	Усредненный показатель частоты предоставления	Усредненный показатель кратности применения
V03.016.003	Общий (клинический) анализ крови	1	1
V03.016.004	Анализ крови биохимический	0,5	1
V03.016.006	Анализ мочи общий	1	1
	Проведение ПЦР для определения уровня мРНК цитокинов		2

Инструментальные методы исследования - дополнительные			
Код медицинской услуги	Наименование медицинской услуги	Усредненный показатель частоты предоставления	Усредненный показатель кратности применения
A04.16.001	Ультразвуковое исследование органов брюшной полости (комплексное)	0,05	1
A05.10.006	Регистрация электрокардиограммы	0,05	1
A06.08.003	Рентгенография придаточных пазух носа	0,1	1
A06.09.007	Рентгенография легких	0,25	1

2.3. Перечень лекарственных препаратов для медицинского применения, зарегистрированных на территории Российской Федерации

Код	Анатомо-терапевтическо-химическая классификация	Наименование лекарственного препарата	Усредненный показатель частоты предоставления	Единицы измерения	ССД ***	СКД ****
A03AD	Папаверин и его производные					
		Дротаверин		мг	0,08	0,4
A11GA	Аскорбиновая кислота (витамин С)		1			
		Аскорбиновая кислота		мг	325	4875
B02AB	Ингибиторы протеиназ плазмы		0,7			
		Апротинин		АТрЕ	15000	90000

B05BB	Растворы, влияющие на водно-электролитный баланс		0,5			
		Натрия лактата раствор сложный [Калия хлорид+Кальция хлорид+Натрия хлорид+Натрия лактат]		мл	250	750
		Меглюмина натрия сукцинат раствор сложный [Натрия хлорид + Калия хлорид + Магния хлорид + Натрия гидроксид + Меглюмина натрия сукцинат]		мл	250	750
B05BC	Растворы с осмодиуретическим действием		0,05			
		Маннитол		г	62	124
B05CB	Солевые растворы		0,7			
		Натрия хлорид		мл	500	5000
B05XA	Растворы электролитов		0,7			
		Магния сульфат		мг	2500	25000
		Калия хлорид		мг	4000	40000
C01DA	Органические нитраты		0,08			
		Нитроглицерин		мг	20	200
C03CA	Сульфонамиды		0,15			
		Фуросемид		мг	90	900
C05CA	Биофлавоноиды		1			
		Рутозид		мг	110	1650
H02AB	Глюкокортикоиды		0,05			
		Дексаметазон		мг	15	75
		Преднизолон		мг	120	600
J01CA	Пенициллины широкого спектра действия		0,05			
		Амоксициллин		мг	3000	30000
J01DD	Цефалоспорины 3-го поколения		0,25			
		Цефтриаксон		мг	2000	14000
J01FA	Макролиды		0,05			
		Азитромицин		мг	500	1500
J01MA	Фторхинолоны		0,06			
		Левофлоксацин		мг	500	7000
		Офлоксацин		мг	800	4000

J05AH	Ингибиторы нейраминидазы		1			
		Осельтамивир		мг	150	750
J05AX	Прочие противовирусные препараты		0,5			
		Умифеновир		мг	800	5600
M01AE	Производные пропионовой кислоты		0,3			
		Ибупрофен		мг	1100	4400
		Напроксен		мг	700	2100
N02BE	Анилиды		0,7			
		Парацетамол		мг	3000	18000
R05CB	Муколитические препараты		0,7			
		Амброксол		мг	90	900
		Ацетилцистеин		мг	500	7500
R06AA	Эфиры алкиламинов		0,7			
		Дифенгидрамин		мг	90	1125
R06AC	Замещенные этилендиамины		0,01			
		Хлоропирамин		мг	87,5	1093,75
V07AB	Растворители и разбавители, включая ирригационные растворы		0,7			
		Вода для инъекций		мл	10	100