



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗ

ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ
ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΗΣ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΑΠΟ ΧΛΑΜΥΔΙΑ ΚΑΙ
ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ALZHEIMER- ΑΝΟΙΑΣ

Σοφία- Χρυσοβαλάντου Ζαγαλιώτη

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
Επιβλέπων
Παντελής Μπάγκος
Αναπληρωτής Καθηγητής

Λαμία, 2018



UNIVERSITY OF THESSALY
FACULTY OF SCIENCES
DEPARTMENT OF COMPUTER SCIENCE AND BIOMEDICAL
INFORMATICS
“INFORMATICS AND COMPUTATIONAL BIOMEDICINE”

SYSTEMATIC REVIEW AND META- ANALYSIS OF THE
CORRELATION BETWEEN CHLAMYDIA INFECTION AND
ALZHEIMER’S DISEASE- DEMENTIA

Sofia- Chrysovalantou Zagalioti

Master thesis
Pantelis Bagos
Associate Professor

Lamia, 2018



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΗ
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ**

«ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΑ»

**ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ
ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΗΣ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΑΠΟ ΧΛΑΜΥΔΙΑ
ΚΑΙ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ALZHEIMER- ΑΝΟΙΑΣ**

Σοφία- Χρυσοβαλάντου Ζαγαλιώτη

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Επιβλέπων

**Παντελής Μπάγκος
Αναπληρωτής Καθηγητής**

Λαμία, 2018

«Υπεύθυνη Δήλωση μη λογοκλοπής και ανάληψης προσωπικής ευθύνης»

Με πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων, και γνωρίζοντας τις συνέπειες της λογοκλοπής, δηλώνω υπεύθυνα και ενυπογράφως ότι η παρούσα εργασία με τίτλο «ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΗΣ ΛΟΙΜΩΣΗΣ ΑΠΟ ΧΛΑΜΥΔΙΑ ΚΑΙ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ALZHEIMERE- ΑΝΟΙΑΣ» αποτελεί προϊόν αυστηρά προσωπικής εργασίας και όλες οι πηγές από τις οποίες χρησιμοποίησα δεδομένα, ιδέες, φράσεις, προτάσεις ή λέξεις, είτε επακριβώς (όπως υπάρχουν στο πρωτότυπο ή μεταφρασμένες) είτε με παράφραση, έχουν δηλωθεί κατάλληλα και ευδιάκριτα στο κείμενο με την κατάλληλη παραπομπή και η σχετική αναφορά περιλαμβάνεται στο τμήμα των βιβλιογραφικών αναφορών με πλήρη περιγραφή. Αναλαμβάνω πλήρως, ατομικά και προσωπικά, όλες τις νομικές και διοικητικές συνέπειες που δύναται να προκύψουν στην περίπτωση κατά την οποία αποδειχθεί, διαχρονικά, ότι η εργασία αυτή ή τμήμα της δεν μου ανήκει διότι είναι προϊόν λογοκλοπής.

Η ΔΗΛΟΥΣΑ

Σοφία-Χρυσοβαλάντου Ζαγαλιώτη

Ημερομηνία

Υπογραφή

**ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ
ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΗΣ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΑΠΟ ΧΛΑΜΥΔΙΑ ΚΑΙ
ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ALZHEIMER- ΑΝΟΙΑΣ**

Σοφία – Χρυσοβαλάντου Ζαγαλιώτη

Τριμελής Επιτροπή:

Παντελής Μπάγκος

Μαρία Αδάμ

Ευριπίδης Μάρκου

Επιστημονικός Σύμβουλος:

Παναγιώτα Κοντού

Ευχαριστίες

Στην προσπάθεια εκπλήρωσης της διπλωματικής μου θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω όλους εκείνους τους καθηγητές, τους φίλους καθώς και την οικογένεια μου, για τη συμβολή τους με τον δικό τους ξεχωριστό τρόπο ο καθένας σε όλη αυτήν την πορεία.

Αρχικά, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Μπάγκο Παντελή για την ανάθεση του θέματος, την άψογη συνεργασία, την καθοδήγηση και τις καίριες συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών. Θα ήθελα επίσης να τον ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη του στο πρόσωπο μου, το αμείωτο ενδιαφέρον αλλά και τον απεριόριστο χρόνο που αφιέρωσε για την εκπόνηση αλλά και τη διόρθωση της παρούσας διπλωματικής. Όμως περισσότερο απ' όλα θα ήθελα να τον ευχαριστήσω γιατί στάθηκε πηγή έμπνευσης και ακαδημαϊκό πρότυπο για μένα, καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου, αποτελώντας το σημείο αναφοράς μου ως νέο επιστήμονα.

Θα ήθελα να εκφράσω τη βαθιά μου εκτίμηση στην Διδάκτωρ κ. Κοντού Παναγιώτα για τη πολύτιμη συνεργασία και τη διαρκή υποστήριξη της για την ομαλή διεξαγωγή της εργασίας. Της είμαι ιδιαίτερα ευγνώμων καθώς με την άριστη γνώση και την ανιδιοτελή βοήθεια της σε όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου, κατάφερα να επιτύχω τους στόχους μου.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω στην οικογένεια και στους φίλους μου για το σεβασμό που έδειξαν στις επιλογές μου και την υποστήριξη τους όλα τα χρόνια των σπουδών μου.

Περίληψη

Εισαγωγή: Χαρακτηριστικά αναφέρεται από τον καθηγητή Ντάγκλας Κελ της Σχολής Χημείας του Πανεπιστημίου του Μάντσεστερ «Αυτό που λέμε είναι ότι υπάρχουν αδιαμφισβήτητες ενδείξεις πως η νόσος Alzheimer έχει μια αφανή μικροβιακή συνιστώσα. Δεν μπορούμε πλέον να αγνοούμε τα στοιχεία». Τα βιβλιογραφικά δεδομένα για το ρόλο των μικροβίων στη νόσο Alzheimer αφθονούν, και για το λόγο αυτό η μελέτη σε αυτά αποτελεί καινοτόμο πεδίο ερευνητικού ενδιαφέροντος. Επομένως, σκοπός της παρούσης διπλωματικής ήταν να μελετηθεί η σχέση του βακτηρίου χλαμυδόφιλα της πνευμονίας σε σχέση με τη νόσο.

Μεθοδολογία: Μετά από μελέτη της υπάρχουσας βιβλιογραφίας, συλλέχθηκαν όλες οι case-control μελέτες από μεταθανάτια δείγματα ανθρώπινου εγκεφάλου (συνολικά 5 μελέτες) για την μελέτη της σχέσης του βακτηρίου με το Alzheimer, καθώς και οι μελέτες των IgG και IgA αντισωμάτων από εξετάσεις αίματος που αφορούσαν τη σχέση του βακτηρίου με την αγγειακή άνοια (3 μελέτες) και καταγράφηκαν τα κοινωνικό-δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών και μαρτύρων. Η παρουσίαση και η περιγραφή των δεδομένων, αλλά και η κατασκευή του μαθηματικού μοντέλου για τον υπολογισμό της στατιστικής σημαντικότητας αυτής της σχέσης έγινε με τη χρήση του STATA.

Αποτελέσματα: Κατά την μετα- ανάλυση των πέντε case-controls μελετών για το Alzheimer βρέθηκε πως υπάρχει στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ του προς μελέτη βακτηρίου και της νόσου Alzheimer ($p < 0,05$, $OR = 17,23$, 95% CI: 2,52-131,89). Παράλληλα, μελετήθηκαν περαιτέρω τα ήδη υπάρχοντα δεδομένα με τη χρήση της αθροιστικής, αφαιρετικής μετα- ανάλυσης και της συνοπτικής καμπύλης SROC. Ενώ βρέθηκε μη στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ του μικροβίου και της αγγειακής άνοιας.

Λέξεις κλειδιά: νόσος Alzheimer, χλαμυδόφιλα της πνευμονίας, αγγειακή άνοια

Abstract

Introduction: As it is characteristically stated by Professor Douglas Kell of the School of Chemistry at the University of Manchester: “what we are saying is that there are unquestionable indications that Alzheimer’s disease has an invisible microbial component. We can no longer ignore the evidence.” The references on the role of the microbes in Alzheimer’s disease are abundant, and for this reason, their study is an innovative field of scientific interest. Consequently, the purpose of this master thesis is to study the relation between the bacterium *Chlamydomydia pneumoniae* and the disease.

Methodology: After the study of the existing literature, all the case-control studies of post-mortal human brain samples were collected (a total of 5 studies) for the study of the relation of the bacterium with Alzheimer’s, as well as the studies of the IgG and IgA antibodies from blood tests that were related to the relation of the bacterium with vascular dementia (3 studies) and the socio-demographic characteristics of the patient and controls were recorded. The presentation and description of the data, as well as the manufacturing of the mathematical model for the calculation of the statistical significance of this relation, took place with the use of STATA software.

Results: During the meta- analysis of the 5 case-control studies for Alzheimer’s there was found to be a statistically significant relation between the examined bacterium and the disease ($p < 0,05$, $OR = 17,23$, $95\% CI: 2,52-131,89$). At the same time, the data were studied with use of the cumulative meta- analysis and the SROC curve. There was found to be no significant relation between the bacterium and vascular dementia.

Key words: Alzheimer’s disease, *Chlamydomydia pneumoniae*, vascular dementia

Πρόλογος

Το υπό μελέτη βακτήριο της πνευμονίας, ο ιός του έρπη και ορισμένα άλλα κοινά μικρόβια ενδέχεται να αποτελούν αιτία της νόσου Alzheimer. Η μικροβιακή αιτία της νόσου έχει παρατηρηθεί σε δεκάδες μελέτες, αλλά δεν της έχει δοθεί η δέουσα σημασία. Μεγάλος αριθμός διαφορετικών παθογόνων μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων ιών, βακτηρίων και μυκήτων, ανευρίσκεται στους εγκεφάλους ηλικιωμένων ανθρώπων και φαίνεται να είναι αυξημένο στους εγκεφάλους ανθρώπων οι οποίοι πεθαίνουν από τη νόσο Alzheimer. Αν η άποψη ότι τα μικρόβια προκαλούν Alzheimer επιβεβαιωθεί μέσω εργαστηριακών ερευνών σε συνδυασμό με στατιστικές μετα- αναλύσεις , τότε μπορεί να αλλάξει η μελλοντική αντιμετώπιση-θεραπεία της νόσου.

Περιεχόμενα

Περίληψη	1
Abstract	2
Πρόλογος	3
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1.1 Εισαγωγή	6
1.2 Τα βακτήρια γενικά	6
1.3 Ιστορικά δεδομένα για τα χλαμύδια	7
1.4 Οικογένεια Chlamydiaceae	7
1.5 Chlamydothila pneumoniae	9
1.6 Άνοια	10
1.7 Περιγραφή νόσου Alzheimer	11
1.8 Παράγοντες κινδύνου	12
1.9 Κλινική εικόνα	12
1.10 Εργαστηριακά ευρήματα	13
1.11 Διαφορική Διάγνωση	13
1.12 Πρόγνωση και θεραπεία	13
1.13 Αγγειακή Άνοια	13
1.14 Η υπόθεση της σχέσης του Chlamydia pneumoniae με τη νόσο Alzheimer.	14
1.15 Σκοπός	14
2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	16
2.1 Στρατηγική αναζήτησης βιβλιογραφίας και κριτήρια επιλογής	16
2.2 Συλλογή και εξαγωγή δεδομένων	16
2.3 Είδος ανάλυσης	20
2.4 Στατιστική ανάλυση	20
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	23
3.1 Δημογραφικά στοιχεία	23
3.2 Υπολογισμός odds ratio (OR), logOR, standard error.	24
3.3 Δείκτες ετερογένειας	26
3.4 Σφάλμα δημοσίευσης	27
3.5 Αθροιστική μετά-ανάλυση	29
3.6 Αφαιρετική μετά-ανάλυση	31
3.7 ROC ανάλυση	32
3.8 Συσχέτιση της αγγειακής άνοιας με το Chlamydia pneumoniae	34
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ	36
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	38

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α	39
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β	46

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Εισαγωγή

Η νόσος Alzheimer είναι μια χρόνια νευροεκφυλιστική ασθένεια που συνήθως παρουσιάζεται μετά τα 65 έτη. Αποτελεί το 60-70% των περιπτώσεων άνοιας [1]. Το μεγάλο αυτό ποσοστό οφείλεται στο γεγονός ότι είναι μη αναστρέψιμη και μη θεραπεύσιμη. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια έχει διατυπωθεί η υπόθεση πως η νόσος του Alzheimer σχετίζεται με λοιμώξεις από μικρόβια και ιούς. Στην παρούσα μελέτη εξετάζεται το ενδεχόμενο η νευροεκφυλιστική ασθένεια, Alzheimer να προκαλείται από το βακτήριο χλαμυδόφιλο της πνευμονίας. Η υπόθεση αυτή καθιστά ελκυστική την πιθανότητα πρόληψης της νόσου αν όντως αποδειχθεί η συσχέτιση με το μικρόβιο.

1.2 Τα βακτήρια γενικά

Το ανθρώπινο σώμα για τα βακτήρια είναι μια περιοχή από περιβαλλοντικές θέσεις που τους παρέχουν την απαραίτητη για την ανάπτυξη τους θερμοκρασία, υγρασία και τροφή. Τα βακτήρια έχουν αποκτήσει γενετικά χαρακτηριστικά που τα καθιστούν ικανά να εισβάλλουν στον ξενιστή, να προσκολλώνται ή να αποικίζουν, να αποκτούν πρόσβαση σε πηγές τροφής (αποικοδομητικά ένζυμα) και να διαφεύγουν από τους ανοσιακούς και μη ανοσιακούς προστατευτικούς μηχανισμούς του ξενιστή (π.χ. έλυτρο). Τα βακτήρια διακρίνονται σε αυτά της φυσιολογικής χλωρίδας π.χ. βοηθούν στην πέψη της τροφής, παράγουν βιταμίνες όπως η βιταμίνη Κ και στα παθογόνα βακτήρια, αυτά δηλαδή που έχουν μηχανισμούς που αναπτύσσονται εντός του ξενιστή σε βάρος των ιστών του και των οργανικών λειτουργιών του. Η νόσος είναι το αποτέλεσμα της βλάβης ή της απώλειας ιστού ή οργανικής λειτουργίας ή της ανάπτυξης φλεγμονώδους αντίδρασης στον ξενιστή. Τα σημεία και τα συμπτώματα μιας νόσου καθορίζονται από τη λειτουργία του προσβεβλημένου ιστού. Η σοβαρότητα της νόσου εξαρτάται από το πόσο σημαντικό είναι το προσβεβλημένο όργανο και από την έκταση της βλάβης. Επίσης, το βακτηριακό στέλεχος και το μέγεθος του ενοφθαλμίσματος είναι κύριοι παράγοντες αναπαραγωγιμότητας για την πρόκληση της νόσου [2, 3].

Για να εγκατασταθεί η λοίμωξη πρέπει αρχικά τα μικρόβια να εισέλθουν στο σώμα. Οι μηχανισμοί της φυσικής ανοσίας και φραγμοί όπως το δέρμα, η βλέννη και το κροσσωτό επιθήλιο στις αναπνευστικές οδούς καθιστούν δύσκολη την είσοδο των μικροοργανισμών στο σώμα. Οι φραγμοί αυτοί όμως πολλές φορές σπάζουν, δημιουργώντας έτσι μια πύλη εισόδου για τα βακτήρια ή τα βακτήρια έχουν τα μέσα να ξεπεράσουν τον φραγμό και να εισβάλλουν στο σώμα.

Έπειτα τα βακτήρια χρησιμοποιούν ειδικούς μηχανισμούς προκειμένου να προσκολληθούν και να αποικίσουν σε διάφορες επιφάνειες του σώματος, όπως είναι οι προσκολλητίνες που έχει η *E.coli* για να συνδέεται με ειδικούς υποδοχείς επιφανείας και να εμποδίζεται η απομάκρυνσή της. Τα παραπροϊόντα της βακτηριακής ανάπτυξης, ιδιαίτερα της ζύμωσης, έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή οξέων, αερίων και άλλων ουσιών που είναι τοξικές για τους ιστούς. Επιπρόσθετα, πολλά μικρόβια απελευθερώνουν αποικοδομητικά ένζυμα που διασπούν τους ιστούς, προσφέροντας έτσι τροφή για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών και προάγοντας την επέκτασή τους. Οι τοξίνες (ενδοτοξίνες και εξωτοξίνες) είναι τέτοια βακτηριακά προϊόντα που προκαλούν άμεση βλάβη στους ιστούς ή πυροδοτούν καταστροφικές βιολογικές δραστηριότητες. Τα βακτήρια έχουν αναπτύξει τρόπους αποφυγής της μείζονος αντιβακτηριακής άμυνας αποφεύγοντας την αναγνώρισή τους από τα φαγοκύτταρα, αδρανοποιώντας ή αποφεύγοντας το συμπλήρωμα και τα αντισώματα, ή ακόμα αναπτυσσόμενα μέσα στα κύτταρα ώστε να προφυλάσσονται από τις αντιδράσεις του ξενιστή. Το έλυτρο είναι ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες λοιμοτοξικότητας [2-4].

1.3 Ιστορικά δεδομένα για τα χλαμύδια

Το 1999, η ταξινόμηση της οικογένειας Chlamydiaceae αναθεωρήθηκε ριζικά, με βάση τις μελέτες του γονιδιώματος αυτών των μικροοργανισμών. Παλαιότερα, η οικογένεια περιλάμβανε ένα μόνο γένος, τα χλαμύδια (Chlamydia), με τέσσερα είδη. Σήμερα, η οικογένεια υποδιαιρείται σε δύο γένη, τα Χλαμύδια (Chlamydia) και τα Χλαμυδόφιλα (Chlamydophila). Τα χλαμύδια του τραχώματος παρέμειναν στο γένος Χλαμύδια, αλλά τα χλαμύδια της ψιπτάκωσης και τα χλαμύδια της πνευμονίας μεταφέρθηκαν στο νέο γένος Χλαμυδόφιλα [2].

Κάποτε πίστευαν πως τα χλαμύδια ανήκουν στους ιούς λόγω του μικρού τους μεγέθους και επειδή είναι υποχρεωτικά ενδοκυττάρια παράσιτα. Όμως, τα χλαμύδια περιέχουν τις παρακάτω ιδιότητες των βακτηρίων: έχουν εσωτερική και εξωτερική μεμβράνη σαν αυτές των Gram -, περιέχουν τόσο DNA όσο και RNA, έχουν προκαρυωτικά ριβοσώματα, συνθέτουν τις δικές τους πρωτεΐνες, πυρηνικά οξέα και λιπίδια και είναι ευαίσθητα σε πολλά αντιμικροβιακά αντιβιοτικά. Σε αντίθεση με άλλα βακτήρια, τα χλαμύδια έχουν χαρακτηριστικό κύκλο ανάπτυξης, σχηματίζοντας μολυσματικές μορφές με ανενεργό μεταβολισμό (στοιχειώδη σωμάτια) και μη μολυσματικές μορφές με ενεργό μεταβολισμό (δικτυωτά σωμάτια) [2, 5].

1.4 Οικογένεια Chlamydiaceae

Όπως ακριβώς οι σπόροι, τα στοιχειώδη σωμάτια είναι ανθεκτικά σε πολλούς δυσμενείς περιβαλλοντικούς παράγοντες. Μολονότι αυτά τα βακτήρια στερούνται την άκαμπτη στιβάδα πεπτιδογλυκάνης των περισσότερων άλλων βακτηρίων, οι πρωτεΐνες της εξωτερικής

μεμβράνης τους είναι σε μεγάλο βαθμό διασυνδεδεμένες με δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ ριζών κυστεΐνης. Τα βακτήρια δεν αναπαράγονται αλλά είναι μολυσματικά όταν έχουν την μορφή των στοιχειωδών σωματίων, αυτό μεταφράζεται ότι μπορούν να συνδεθούν με υποδοχείς των κυττάρων ξενιστών και να προκαλέσουν την πρόσληψη τους από τα μολυσματικά κύτταρα. Η μορφή των δικτυωτών σωματίων είναι αυτή που έχει ενεργό μεταβολισμό και αναπαράγεται. Επειδή στα δικτυωτά σωματίδια απουσιάζει η εκτεταμένη διασύνδεση πρωτεϊνών η μορφή αυτή είναι ωσμωτικός εύθραυστη, ωστόσο, τα δικτυωτά σωματίδια είναι προφυλαγμένα καθώς βρίσκονται στο εσωτερικό των κυττάρων [2, 5].

Άλλα δομικά στοιχεία των χλαμυδίων είναι ο ειδικός για το γένος πολυσακχαρίτης, που μπορεί να ανιχνευθεί με τη δοκιμασία σύνδεσης συμπληρώματος (CF), και οι ειδικές για το είδος και το στέλεχος πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης [2].

Τα χλαμύδια αναπαράγονται με έναν μοναδικό κύκλο ανάπτυξης που λαμβάνει χώρα εντός των κυττάρων του ευπαθούς ξενιστή. Ο κύκλος αρχίζει όταν τα μικρά, μολυσματικά στοιχειώδη σωματίδια προσκολληθούν στις μικρολάχνες των ευπαθών κυττάρων και ακολούθως διεισδύουν στα κύτταρα- ξενιστές. Μετά την είσοδο τους, τα βακτήρια παραμένουν μέσα σε κυτταροπλασματικά φαγοσωμάτια, όπου λαμβάνει χώρα ο αναπαραγωγικός κύκλος. Η σύντηξη των κυτταρικών λυσοσωματίων με τα περιέχοντα στοιχειώδη σωματίδια- φαγοσωμάτια και η επακόλουθη ενδοκυττάρια θανάτωση αναστέλλονται. Η σύντηξη φαγοσωματίου- λυσοσωματίου αποτρέπεται εάν η εξωτερική μεμβράνη είναι άθικτη. Εάν η εξωτερική μεμβράνη έχει βλάβη ή εάν τα βακτήρια έχουν αδρανοποιηθεί από θερμότητα ή έχουν επικαλυφθεί με αντισώματα η σύντηξη φαγοσωματίου- λυσοσωματίου λαμβάνει χώρα με συνακόλουθη θανάτωση των βακτηρίων [2].

Εντός 6-8 ωρών από την είσοδο τους στα κύτταρα, τα στοιχειώδη σωματίδια αναδιοργανώνονται στα μεγαλύτερου μεγέθους και μεταβολικώς ενεργά δικτυωτά σωματίδια, τα οποία είναι ικανά να συνθέσουν το δικό τους γενετικό αποτύπωμα, DNA, RNA και πρωτεΐνες. Τα χλαμύδια είναι ενεργειακά παράσιτα επειδή χρησιμοποιούν την τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) του κυττάρου- ξενιστή για τις ενεργειακές τους ανάγκες. Μερικά στελέχη μπορεί ακόμη να προμηθεύονται από τον ξενιστή συγκεκριμένα αμινοξέα. Τα δικτυωτά στοιχεία αναπαράγονται με διχοτόμηση, που συνεχίζεται τις επόμενες 18-24 ώρες. Οι ιστολογικές χρώσεις αναδεικνύουν εύκολα τα φαγοσωμάτια με τα συσσωρευμένα δικτυωτά στοιχεία, γνωστά ως έγκλειστα. Περίπου 18- 24 ώρες μετά τη λοίμωξη, τα δικτυωτά στοιχεία αρχίζουν να αναδιοργανώνονται στα μικρότερα στοιχειώδη σωματίδια και μετά από 48 έως 72 ώρες το κύτταρο ρήγνυται και απελευθερώνει τα μολυσματικά στοιχειώδη σωματίδια [2].

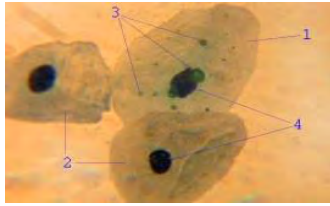
1.5 Chlamydomphila pneumoniae

Το χλαμυδόφιλο της πνευμονίας απομονώθηκε για πρώτη φορά από τον επιπεφυκότα παιδιού στη Ταϊβάν. Αρχικά θεωρήθηκε ως στέλεχος της ψιπτάκωσης επειδή η μορφολογία των εγκλείστων που σχηματίστηκαν στην κυτταροκαλλιέργεια ήταν παρόμοια. Αργότερα όμως διαπιστώθηκε ότι το στέλεχος της Ταϊβάν (TW-183) ήταν ορολογικά συγγενές με ένα φαρυγγικό στέλεχος, το επονομαζόμενο AR-39, και δεν είχε καμία σχέση με τα στελέχη της ψιπτάκωσης. Ο νέος αυτός μικροοργανισμός ονομάστηκε αρχικά TWAR, μετά ταξινομήθηκε ως χλαμύδιο της πνευμονίας (*Chlamydia pneumoniae*) και τελικά τοποθετήθηκε στο νέο γένος χλαμυδόφιλα. Έχει αναγνωρισθεί μόνο ένας ορότυπος (TWAR). Η λοίμωξη μεταδίδεται με αναπνευστικές εκκρίσεις και δεν έχει βρεθεί ζωικό υπόδοχο [2, 5, 6].

Το χλαμυδόφιλο της πνευμονίας είναι παθογόνο του ανθρώπου. Αποτελεί σημαντικό αίτιο βρογχίτιδας, πνευμονίας και παραρρινοκολπίτιδας και οι λοιμώξεις μεταδίδονται από άτομο σε άτομο με τις αναπνευστικές εκκρίσεις. Η λοίμωξη πιστεύεται ότι είναι αρκετά συνηθισμένη (εκτιμάται ότι κάθε χρόνο εμφανίζονται 200.000- 300.000 περιπτώσεις πνευμονίας), κυρίως στους ενήλικες. Περισσότεροι από τους μισούς ασθενείς έχουν ορολογική ένδειξη προγενέστερης λοίμωξης. Οι περισσότερες λοιμώξεις από το χλαμυδόφιλο της πνευμονίας είναι ασυμπτωματικές ή ήπιες με επίμονο βήχα και αδιαθεσία, οι περισσότεροι ασθενείς δεν χρειάζονται νοσηλεία σε νοσοκομείο. Οι πιο σοβαρές αναπνευστικές λοιμώξεις προσβάλλουν τυπικά έναν ολόκληρο λοβό του πνεύμονα και είναι πολύ δύσκολο να διακριθούν από τις άτυπες πνευμονίες που προκαλούν το μυκόπλασμα της πνευμονίας, η λεγεωνέλλα και οι αναπνευστικοί ιοί [2].

Η διάγνωση της λοίμωξης από χλαμυδόφιλο της πνευμονίας είναι δύσκολη. Ο μικροοργανισμός δεν αναπτύσσεται στις κυτταρικές γραμμές που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση του χλαμύδια του τραχώματος και παρ' ότι το χλαμυδόφιλο της πνευμονίας αναπτύσσεται στην κυτταρική γραμμή Hep-2, αυτή δεν χρησιμοποιείται στα περισσότερα κλινικά εργαστήρια. Η ανεύρεση του χλαμυδόφιλου της πνευμονίας με NAAT υπήρξε επιτυχής και φαίνεται ότι αυτές είναι οι πιο ευαίσθητες διαγνωστικές μέθοδοι από τις υπάρχουσες. Εντούτοις, τα περισσότερα εργαστήρια δεν εκτελούν NAAT σήμερα. Οι δοκιμασίες CF ή MIF μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ορολογική διάγνωση. Επειδή η CF αντιδρά τόσο με χλαμύδια όσο και με χλαμυδόφιλα, δεν είναι ειδική για τις λοιμώξεις από χλαμυδόφιλα της πνευμονίας, ενώ η MIF που αντιδρά με τα στοιχειώδη σωματίδια του χλαμυδόφιλο της πνευμονίας είναι ειδική [6].

Οι λοιμώξεις θεραπεύονται με μακρολίδες (εριθρομυκίνη, αζιθρομυκίνη, κλαριθρομυκίνη), τετρακυκλίνες (τετρακυκλίνη, δοξυκυκλίνη) και η θεραπεία διαρκεί 10-14 μέρες. Η πρόληψη της έκθεσης στο χλαμυδόφιλο της πνευμονίας είναι δυσχερής λόγω της ευρείας διάδοσης του βακτηρίου [2].



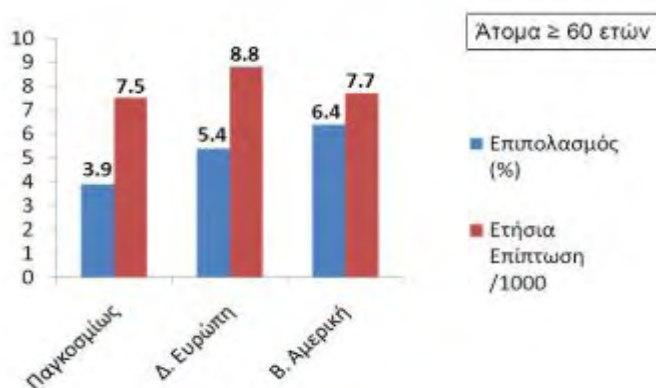
Εικόνα 1. Μικρογραφία των χαλαμυδόφιλα της πνευμονίας σε ένα επιθηλιακό κύτταρο σε οξεία βρογχίτιδα. 1. Επιμολυσμένο επιθηλιακό κύτταρο 2. Υγιή επιθηλιακά κύτταρα 3. Χαλαμυδόφιλα της πνευμονίας.

1.6 Άνοια

Η άνοια χαρακτηρίζεται από μια προϊούσα νοητική έκπτωση και από διαταραχές και υποβάθμιση της προσωπικότητας σ' ένα άτομο με φυσιολογικές μέχρι τότε τις λειτουργίες αυτές.

Στην αιτιολογία της άνοιας περιλαμβάνονται διάχυτες ή διάσπαρτες εγκεφαλικές βλάβες από εκφυλιστικές, αγγειακές, μεταβολικές, τοξικές, φλεγμονώδεις, νεοπλασματικές, λοιμώδεις και τραυματικές αιτίες.

Το 50% των περιπτώσεων με άνοια είναι πρωτοπαθούς εκφυλιστικής αιτίας του τύπου Alzheimer. Οι αγγειακές αιτίες άνοιες καλύπτουν το 10-20% των περιπτώσεων με τη μορφή της πολυεμφραγματικής εγκεφαλοπάθειας, της νόσου Binswager κα. Οι περιπτώσεις αυτές των αγγειακών ανοιών διαφέρουν από τις εκφυλιστικές άνοιες από τη ταχεία σχετικά έναρξη τους, τη συχνή παρουσία υπέρτασης και καρδιαγγειακής νόσου, τη χαρακτηριστική εικόνα στην αξονική ή μαγνητική τομογραφία με ασύμμετρα κατανεμημένες ατροφικές περιοχές και έμφρακτα. Σε αντίθεση, άρρωστοι με την πιο κοινή εκφυλιστική άνοια τύπου Alzheimer παρουσιάζουν ελάχιστα αντικειμενικά ευρήματα στη συνήθη φυσική νευρολογική εξέταση και η αξονική τομογραφία έχει χαρακτηριστική εικόνα συμμετρικής φλοιικής ατροφίας και διάτασης των κοιλιών[7, 8].



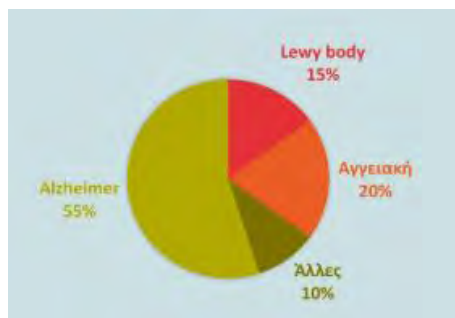
Εικόνα 2. Επιδημιολογία της άνοιας (Ferri CP. et al. Lancet Neurol 2005 Alz Dis International Dec 2008)

1.7 Περιγραφή νόσου Alzheimer

Πρόκειται για μια συχνή εκφυλιστική νόσο του εγκεφάλου με κύρια εκδήλωση την άνοια και ιστοπαθολογική εικόνα με νευροϊνιδικές αλλοιώσεις και γεροντικές πλάκες. Είναι νόσος κυρίως της μεγάλης ηλικίας, αλλά μπορεί να παρατηρηθεί και σε μεσήλικες. Πολύ σπάνια μπορεί να εμφανισθεί σε ηλικία μικρότερη των 40 [7, 9].

1.7.1 Επιδημιολογία

Είναι η πιο κοινή αιτία άνοιας. Αποτελεί το 55% του συνόλου των ανοιών. Η επίπτωση της νόσου είναι 123 ανά 100.000 ανά έτος. Ο επιπολασμός αυξάνεται με την ηλικία, αδρά διπλασιαζόμενος ανά 5 έτη, από το 1% στον πληθυσμό ηλικίας γύρω στα 65 χρόνια στο 15-18% στον πληθυσμό ηλικίας γύρω στα 80 χρόνια. Η συχνότητα στα δύο φύλα είναι ίδια [9].



Εικόνα 3. Η νόσος Alzheimer είναι η πιο κοινή μορφή άνοιας μεταξύ ατόμων ηλικίας άνω των 50 ετών, στην εικόνα απεικονίζονται τα ποσοστά εμφάνισης των συχνότερων αιτιών άνοιας.

1.7.2 Αιτιολογία και παθολογική ανατομική

Η αιτιολογία έως τώρα παραμένει άγνωστη. Τελευταία, με τη διαπίστωση νευροχημικής βλάβης στο επίπεδο των νευροδιαβιβαστών αρχίζουν να διαφαίνονται σοβαρές ελπίδες για διαλεύκανση της αιτίας. Οι δύο επικρατέστερες θεωρίες στην αιτιολογία της νόσου επικεντρώνονται η μια σε γενετικό παράγοντα και η άλλη σε περιβαλλοντικό. Οι περισσότερες πάντως περιπτώσεις είναι πιθανόν πολυγονικές (από πολλά γονίδια) και σχετίζονται επιπρόσθετα με περιβαλλοντικούς παράγοντες και με την ηλικία [7].

Μακροσκοπικά, ο εγκέφαλος παρουσιάζει διάχυτη γενικευμένη ατροφία του φλοιού, που μπορεί να είναι εντονότερη στις κροταφικές περιοχές. Τα κύρια μικροσκοπικά ευρήματα είναι στον φλοιό με μείωση και εκφύλιση των νευρώνων, καθώς και με εμφάνιση των χαρακτηριστικών αργυροφιλικών 'γεροντικών πλακών' και 'νευροϊνιδικών αλλοιώσεων τύπου Alzheimer'. Οι γεροντικές πλάκες είναι μεγάλες εξωκυττάριας βλάβες με β-αμυλοειδική

πρωτεΐνη στο κέντρο τους που προέρχεται από τη διάσπαση της αμυλοειδικής πρόδρομου πρωτεΐνης. Οι πλάκες είναι το αποτέλεσμα της συσσώρευσης διαφόρων πρωτεϊνών και μιας φλεγμονώδους αντίδρασης γύρω από το β- αμυλοειδές. Οι νευροϊνδικές αλλοιώσεις είναι ενδοκυττάρια βλάβες αποτελούμενες κυρίως από μια ανώμαλη μορφή της μικρωσωληναριακής πρωτεΐνης tau. Η απώλεια των νευρώνων είναι εκτεταμένη (βασικά στο νεοφλοιό, περισσότερο στον ιππόκαμπο, αλλά επίσης στον βασικό πυρήνα Meynert και στον υπομέλανα τόπο), υπερβαίνει το 40% και αφορά κυρίως χολινεργικούς, νοραδρενεργικούς και ντοπαμινεργικούς νευρώνες. Επιπρόσθετα, υπάρχει απώλεια των συνάψεων μεταξύ των νευρώνων και αυτή σχετίζεται περισσότερο από οτιδήποτε άλλο με τη βαρύτητα της νόσου [7].

1.8 Παράγοντες κινδύνου

Κύριοι παράγοντες κινδύνου είναι η ηλικία (άνω των 65 ετών) , το οικογενειακό ιστορικό (η ύπαρξη της νόσου σε συγγενή πρώτου βαθμού αυξάνει τον κίνδυνο κατά 3,5 φορές, πιθανόν λόγω υπάρξεως κοινής γενετικής προδιάθεσης), η συννοσηρότητα (αρτηριακή υπέρταση, σακχαρώδης διαβήτης, δυσλιπιδαιμία, καρδιαγγειακή νόσος), ο τρόπος ζωής (αλκοόλ, κάπνισμα) και η κατάσταση της απολιποπρωτεΐνης E (ApoE) . Υπάρχουν τρεις τύποι απολιποπρωτεϊνών (ε2,ε3,ε4) και η ε4 σχετίζεται με τη νόσο Alzheimer.

1.9 Κλινική εικόνα

Χαρακτηρίζεται από χρόνια οργανικό ψυχοσύνδρομο με κύριο στοιχείο την άνοια. Υπάρχει αρχικά διαταραχή της πρόσφατης μνήμης και επιπρόσθετα αλλαγή της προσωπικότητας, διαταραχή της κρίσεως, διαταραχές προσανατολισμού αρχικά σε χρόνο και διαταραχές του λόγου, κυρίως με τη μορφή της κατανομαστικής αφασίας (δυσκολία στην ανεύρεση των σωστών ονομάτων ατόμων και αντικειμένων). Βαθμιαία η άνοια επιτείνεται και μαζί με έκδηλες αφασικές, απρακτικές και αγνωσικές διαταραχές καλύπτουν την κλινική εικόνα και παρεμβαίνουν και περιορίζουν την επαγγελματική και κοινωνική λειτουργικότητα του ατόμου. Άλλες εκδηλώσεις είναι η έλλειψη αναστολών, η ευφορική διάθεση ή η κατάθλιψη, οι ψευδαισθήσεις, οι παρανοϊκές ιδέες, η παραμέληση των κανόνων υγιεινής και, τελικά, η γενική αδράνεια με απώλεια κοπράνων και ούρων, δηλαδή μη συμβατές κοινωνικά συμπεριφορές. Εξωπυραμιδικές διαταραχές και μυοκλονίες εκδηλώνονται σε προχωρημένα στάδια. Πρωτόγονα αντανακλαστικά βρίσκονται συχνά στην κλινική εξέταση [7, 10].

Συχνά είναι εύκολη η διάγνωση της άνοιας με τη λήψη ιστορικού (κυρίως από το άμεσο συγγενικό περιβάλλον του αρρώστου, καθόσον συχνά ο ασθενής δεν αντιλαμβάνεται ότι ξεχνάει ή ότι είναι ανεπαρκής στη δουλειά του, την οποία μέχρι πρόσφατα διεκπεραιώνει πολύ

καλά) και την κλινική εξέταση, αλλά σε άλλες περιπτώσεις είναι απαραίτητο η διάγνωση να επιβεβαιωθεί με νευροψυχολογικές δοκιμασίες [7, 10].

1.10 Εργαστηριακά ευρήματα

Το ηλεκτροεγκεφαλογράφημα είναι φυσιολογικό ή υπάρχει διάχυτη βραδυαρρυθμία. Στην αξονική και μαγνητική τομογραφία υπάρχει χαρακτηριστική διάταση των κοιλιών και συμμετρική φλοιική ατροφία, κυρίως στους κροταφικούς λοβούς, αλλά μερικές φορές οι αλλοιώσεις είναι εκφυλιστικές συμβατές με την ηλικία του ασθενούς [7].

1.11 Διαφορική Διάγνωση

Η διάγνωση βασίζεται στην ανάπτυξη άνοιας με αφασικές, απρακτικές και αγνωσικές διαταραχές. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με την αγγειακή άνοια, όπου από νωρίς και αιφνιδίως έχουμε πυραμιδικές και ψευδοπρομηκικές εκδηλώσεις, υπέρταση κα. Διαφορική διάγνωση θα γίνει επίσης από άλλες άνοιες, όπως εκφυλιστικές, της νόσου του AIDS, της αγγειίτιδας, του ΚΝΣ κα. Χωροκατακτητικές εξεργασίες (νεοπλασίες) θα αποκλεισθούν με νευροαπεικονιστικές εξετάσεις. Πρέπει επίσης να αποκλειστούν οι καταστάσεις εκείνες που προκαλούν θεραπεύσιμη- αναστρέψιμη άνοια, όπως ο υποθυρεοειδισμός, η έλλειψη βιταμίνης B12, ένα υποσκληρίδιο αιμάτωμα κα. Διαφορική διάγνωση θα γίνει και από την κατάθλιψη που μπορεί να προκαλεί ψευδοανοϊκά συμπτώματα, όπως και από την τοξική κατάσταση από αντιχολινεργικά φάρμακα [7, 10].

1.12 Πρόγνωση και θεραπεία

Η νόσος έχει προοιούσα επιδείνωση και ο ασθενής σε λίγα έτη δεν είναι σε θέση να αυτοεξυπηρετηθεί. Η μέση επιβίωση είναι 6-12 χρόνια. Ουσιαστική θεραπεία δεν υπάρχει. Υπάρχει συμπτωματική- υποστηρικτική θεραπεία με αναστολείς της κεντρικής ακετυλοχολινεστεράσης (ριβαστιγμίνη, γαλανταμίνη). Χορηγούνται σε ήπιες ή μέσης βαρύτητας μορφές της νόσου και επιβραδύνουν την προοδευτική της πορεία. Η θεραπεία της κατάθλιψης ή των διαταραχών συμπεριφοράς γίνεται με τα ανάλογα φάρμακα. Τα αντιψυχωσικά πρέπει να δίνονται όταν οι διαταραχές είναι αρκετά έντονες, γιατί επηρεάζουν την φυσιολογική νοητική κατάσταση και προκαλούν εξωπυραμιδικά συμπτώματα [11].

1.13 Αγγειακή Άνοια

Αποτελεί ένα ετερογενές σύνδρομο παρά μια διακριτή νοσολογική οντότητα, στην οποία η υποκείμενη αγγειοεγκεφαλική νόσος οδηγεί σε γνωσιακή δυσλειτουργία και τελικά σε άνοια.

Υπάρχει σημαντική επικάλυψη μεταξύ της αγγειακής άνοιας και της νόσου Alzheimer, οι οποίες συχνά συνυπάρχουν και μοιράζονται κοινά αιτιολογικά και παθογενετικά χαρακτηριστικά. Η αγγειακή άνοια εντάσσεται στο ευρύτερο πλαίσιο της αγγειακής γνωσιακής δυσλειτουργίας που συμπεριλαμβάνει επιπρόσθετα τη μικτή άνοια καθώς και την αγγειακή γνωσιακή δυσλειτουργία χωρίς άνοια. Η αγγειακή άνοια είναι ο δεύτερος πιο συχνός τύπος άνοιας. Ενδείξεις εκτελεστικής δυσλειτουργίας, αγγειακοί παράγοντες κινδύνου(υπέρταση, διαβήτης, εγκεφαλικό/παροδικό ισχαιμικό επεισόδιο, στεφανιαία νόσος, καρδιαγγειακό υπόβαθρο κ.ά.), ιστορικό αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου (ΑΕΕ) και υψηλό Hachinski Ischemic Score (Score ≥ 7) υποστηρίζουν τη διάγνωση της αγγειακής άνοιας ή της μικτής άνοιας. Η επίπτωση της αγγειακής άνοιας μετά από ΑΕΕ είναι υψηλή. Η επιθετική αντιμετώπιση των καρδιαγγειακών παραγόντων κινδύνου ιδιαίτερα σε ασθενείς που έχουν υποστεί ΑΕΕ θεωρείται πρωταρχικής σημασίας για την πρόληψη της αγγειακής άνοιας [12].

1.14 Η υπόθεση της σχέσης του *Chlamydia pneumoniae* με τη νόσο Alzheimer.

Η επικρατέστερη άποψη σχετικά με την παθογένεση του Alzheimer από το *Chlamydia pneumoniae* αναφέρει πως το βακτήριο προκαλεί φλεγμονή μέσω της αδρανούς του μη-λοιμογόνου μορφής, που ενδημεί μη ανιχνεύσιμη στον οργανισμό, σε αντίθεση με τη φάση του ταχέως πολλαπλασιασμού του, η οποία οδηγεί σε συμπτώματα λοίμωξης και το καθιστά ανιχνεύσιμο. Ο τρόπος με τον οποίο όμως φτάνει στον εγκέφαλο το βακτήριο περιλαμβάνει δύο οδούς: Η πρώτη έχει να κάνει με τη μόλυνση των μονοκυττάρων από το βακτήριο, και την εν συνεχεία είσοδο τους μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, και τη διαφοροποίησή τους προς μικρογλοία. Η δεύτερη οδός περιλαμβάνει την άμεση είσοδο του μικροοργανισμού στο κεντρικό νευρικό σύστημα μέσω της αναπνευστικής οδού και της λοίμωξης του ανώτερου αναπνευστικού που αυτός προκαλεί [13].

Η υπόθεση αυτή όμως δεν αποτελεί καινοτόμο πεδίο, καθώς παρόμοιες μελέτες προσπαθούν να αναλύουν τη σχέση του μικροβίου και με άλλες νευρολογικές νόσους όπως τη σκλήρυνση κατά πλάκας [14], τη νόσο του Parkinson [15].

1.15 Σκοπός

Είναι γνωστό ότι η νόσος του Alzheimer είναι άμεσα συνδεδεμένη με τη φλεγμονώδη διαδικασία που οδηγεί σε οξειδωτικό στρες και κατ'επέκταση σε εκφύλιση των υπεύθυνων κυττάρων. Περίπου στα μέσα του 20^{ου} αιώνα (1965) παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στους εγκεφάλους ατόμων με τη νόσο και βρέθηκε το βακτήριο *Chlamydia pneumoniae*. Το γεγονός αυτό αποτέλεσε αφορμή για να ξεκινήσουν εκτενέστερες μελέτες σχετικά με τη σύνδεση του βακτηρίου με τη νόσο.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η συστηματική ανασκόπηση των βιβλιογραφικών ερευνών σχετικά με την συσχέτιση της νόσου Alzheimer και του βακτηρίου χλαμυδόφιλα της πνευμονίας και έπειτα η μετά- ανάλυση των δεδομένων.

2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.1 Στρατηγική αναζήτησης βιβλιογραφίας και κριτήρια επιλογής

Στην παρούσα διπλωματική εργασία διεξάχθηκε αναζήτηση των άρθρων στην βιβλιογραφική βάση δεδομένων PubMed, με το εξής ερώτημα:

chlamydia AND (alzheimer OR dementia).

Όμως κατά την μελέτη των άρθρων που προέκυψαν μετά της παραπάνω αναζήτησης, τέθηκε και το ερώτημα της ύπαρξης συσχέτισης μεταξύ του βακτηρίου και της αγγειακής άνοιας. Οπότε έγινε μια νέα αναζήτηση με σκοπό την αξιολόγηση και αυτής της νέας σχέσης. Το ερώτημα στην προκειμένη περίπτωση ήταν το εξής:

chlamydia and vascular dementia

Επιλέχθηκαν μόνο μελέτες ασθενών μαρτύρων(case studies) και στις δύο περιπτώσεις. Για τη νόσο Alzheimer επιλέχθηκαν μόνο εκείνες που αφορούσαν μεταθανάτια δείγματα ανθρώπινου εγκεφαλικού ιστού, τα οποία μελετήθηκαν ανοσοιστοχημικά, με PCR για τη παρουσία του βακτηρίου. Απορρίφθηκαν οι μελέτες σε πειραματόζωα (ποντίκια), οι μελέτες που έγιναν με τη χρήση κυτταροκαλλιεργειών που μολύνθηκαν in vitro και οι μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκε εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Ενώ για την αγγειακή άνοια έγιναν αποδεκτές μόνο μελέτες που χρησιμοποίησαν δείγματα ανθρώπινου αίματος και ελέγχθηκαν για την παρουσία αντισωμάτων IgG και IgA. Παράλληλα σε οποιαδήποτε από τις δύο αναζητήσεις προέκυψαν βιβλιογραφικές ανασκοπήσεις, μελετήθηκαν εκ νέου για την προσθήκη ή όχι καινούργιων άρθρων. Τέλος δεν τέθηκαν περιορισμοί σχετικά με τη χώρα και τη γλώσσα γραφής της δημοσίευσης.

2.2 Συλλογή και εξαγωγή δεδομένων.

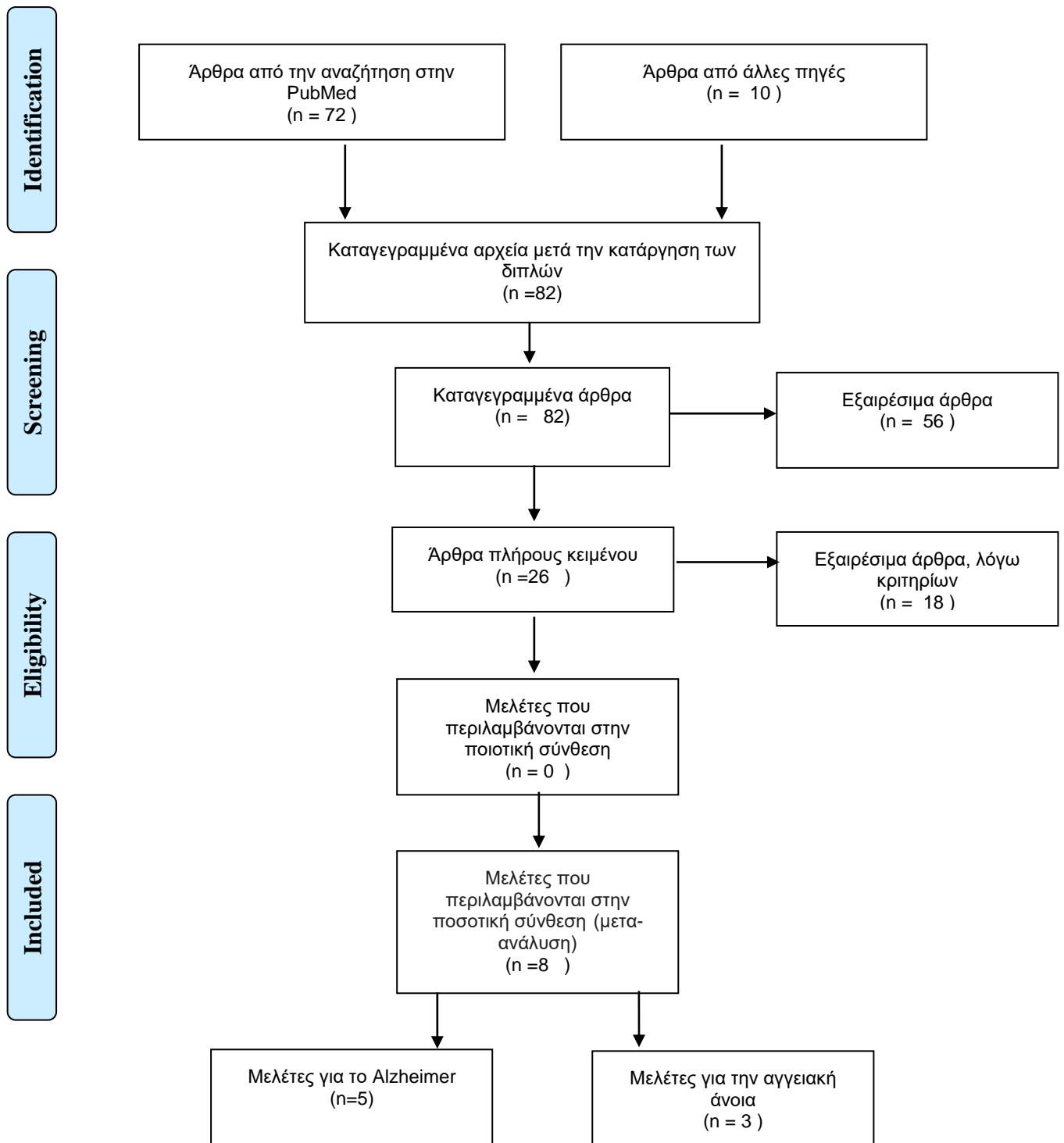
Αρχικά έγινε καταγραφή όλων των άρθρων που εμφανιζόταν στις παραπάνω αναζητήσεις σε φύλλο του excel. Έπειτα επιλέχθηκαν μόνο οι μελέτες ασθενών-μαρτύρων και κατεγράφησαν τα δεδομένα στα οποία διενεργήθηκε η κάθε έρευνα, δηλαδή μελέτες σε ποντίκια ή σε ανθρώπους, μελέτες από δείγματα αίματος ή από μεταθανάτια δείγματα ανθρώπινου εγκεφάλου ή γονιδιωματική ανάλυση απομονωμένων μολυσμένων κυττάρων με το βακτήριο από ανθρώπινους ιστούς ή δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού ή καλλιέργειες κυττάρων, καθώς και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν ELISA ή PCR.

Τελικά μετά τη συλλογή όλων αυτών των στοιχείων στο excel, επιλέχθηκαν οι case -studies μελέτες που αφορούσαν το Alzheimer και την αγγειακή άνοια. Για τη νόσο Alzheimer οι μελέτες είχαν δεδομένα τα οποία προήλθαν από μεταθανάτια δείγματα ανθρώπινου εγκεφάλου από

διάφορα σημεία (μετωπιαίο λοβό, κροταφικό, ινιακό λοβό, ιππόκαμπο, βασικά γάγγλια, παρεγκεφαλίδα). Συγκεκριμένα σε κάθε μελέτη δεν υπήρχαν δείγματα από όλες τις παραπάνω τοπογραφίες του εγκεφάλου, αλλά από κάποιες από αυτές. Η μέθοδος εργαστηριακής ανάλυσης για το βακτήριο έγινε με τη PCR, μεθόδου για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό μιας αλληλουχίας DNA. Ενώ για την αγγειακή άνοια τα δεδομένα προήλθαν από απλή εξέταση πλάσματος, με προσδιορισμό των IgG και IgA αντισωμάτων έναντι του βακτηρίου χλαμύδια της πνευμονίας, όπου καταγράφηκαν οι τίτλοι των αντισωμάτων.

Για κάθε μελέτη στα φύλλα του excel κατεγράφησαν τόσο οι ασθενείς με Alzheimer ή αγγειακή άνοια που έφεραν το βακτήριο, καθώς και αυτοί που δεν φέραν το βακτήριο όσο και οι υγιείς-μάρτυρες για τις δύο νόσους αντίστοιχα που έφεραν ή δεν έφεραν το βακτήριο. Επίσης, έγινε καταγραφή της μέσης ηλικίας ασθενών και μαρτύρων και του ποσοστού των αρσενικών και θηλυκών ατόμων που πήραν μέρος στην έρευνα.

Οι παραπάνω σταδιακή διαλογή απεικονίζεται σε διάγραμμα ροής ή ροογράφημα (flow chart) με βάση το πρότυπο από το PRISMA. Στο διάγραμμα αυτό αναπαριστάτε ένας αλγόριθμος, δείχνοντας τα βήματα της διαλογής ως κουτιά που συνδέονται μεταξύ τους με βέλη. Τα δεδομένα αναπαρίστανται σε κουτιά και τα βέλη δείχνουν τη ροή των δεδομένων. Έτσι επιτυγχάνεται ο σχεδιασμός της ανάλυσης και γίνεται ευκολότερος ο έλεγχος και επανέλεγχος αυτής της χρονοβόρου διαδικασίας, που περιεγράφηκε παραπάνω.



Εικόνα 4. Flow chart ή διάγραμμα ροής.

Πίνακας 1. Στον πίνακα αυτό παρουσιάζονται τα στοιχεία των πέντε μελετών που χρησιμοποιήθηκαν στη μετα-ανάλυση για τη νόσο Alzheimer, καθώς και ο αριθμός των συμμετεχόντων σε κάθε μελέτη. Τα δεδομένα προήλθαν από μεταθανάτια δείγματα ανθρώπινου εγκεφάλου, ασθενών που διαγνώστηκαν με Alzheimer εν ζωή με κλινικά κριτήρια.

First author	Year	PMID	Country	No. of cases	Mean age of cases	Male in cases	No. of controls	Mean age of controls	Male in controls
Herve C. Gerard	2006	17052268	Detroit, USA	25	79.3	11	27	65.9	18
Herve C. Gerard	2005	15998578	Detroit, USA	21	78.09	10	1	72	1
Matthew A. Wozniak	2003	12927758	Manchester, United Kingdom	4	76	1	16	76	13
Rinq RH	2000	10878049	California, USA	15	77	10	5	86.2	2
Balin BJ	1998	9749980	Detroit, USA	19	77.7	3	19	72.6	10

Πίνακας 2. Στον πίνακα παρουσιάζονται τα δεδομένα των τριών μελετών που χρησιμοποιήθηκαν στη μετα-ανάλυση για την αγγειακή άνοια και ο αριθμός των συμμετεχόντων σε κάθε μελέτη. Η μελέτη αφορούσε τις ανοσοσφαιρίνες από εξετάσεις αίματος.

STUDY	Year	PMID	Country	No. of cases	Mean age of cases	Male in cases	No. of controls	Mean age of controls	Male in controls
Hideki Yamamoto	2005	15817002	Tokyo, Japan	31	79	24	32	77	18
Soo Chan Carusone	2004	15476562	Canada	28	76.2	18	24		
H. Wehr	2005	16645274	Warsaw, Poland	229	71.8	96	144	70.5	67

2.3 Είδος ανάλυσης

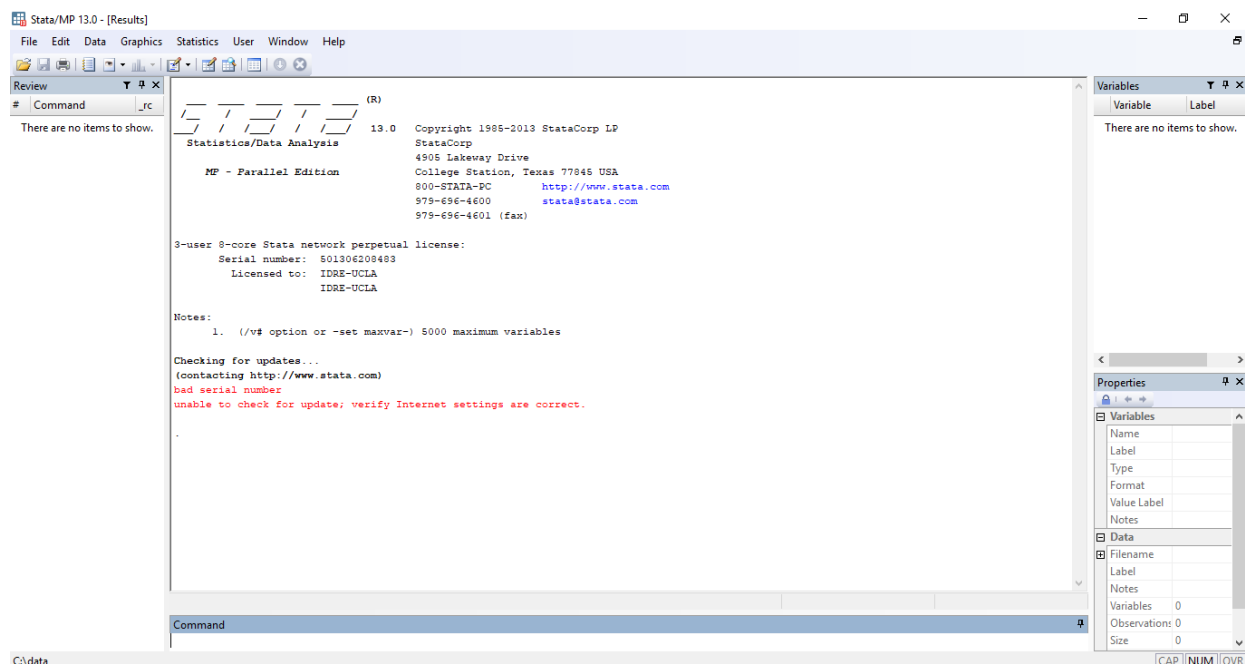
Μετά-ανάλυση

Η μετά- ανάλυση είναι ένα στατιστικό εργαλείο που χρησιμοποιεί τα δεδομένα της συστηματικής ανασκόπησης (τα δεδομένα δηλαδή του προηγούμενου βήματος), έτσι ώστε να δημιουργηθεί η τελική συνοπτική εκτίμηση των αποτελεσμάτων. Ο λόγος επιλογής αυτής της ανάλυσης έγινε για να αυξηθεί η στατιστική ισχύ του τελικού αποτελέσματος καθώς συνδυάζονται τα αποτελέσματα διαφόρων μελετών που είναι αντιφατικά μεταξύ τους και έχουν μικρό αριθμό συμμετεχόντων. Οδηγεί λοιπόν στον υπολογισμό ενός τελικού αποτελέσματος με μεγαλύτερη ακρίβεια και εγκυρότητα απ' ότι κάθε επιμέρους μελέτη ξεχωριστά.

Βασικά βήματα πριν την μαθηματική διαδικασία συνδυασμού των αποτελεσμάτων των επιμέρους μελετών είναι η εκτίμηση του σφάλματος δημοσίευσης ή publication bias και η εκτίμηση της ετερογένειας μεταξύ των μελετών.

2.4 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση έγινε με το STATA/SE, το οποίο αποτελεί την ταχύτερη και μεγαλύτερη έκδοση του STATA .Αυτή η έκδοση μπορεί να αναλύσει περισσότερα δεδομένα από οποιαδήποτε άλλη έκδοση STATA. Γενικά , είναι ένα στατιστικό εργαλείο που χρησιμοποιείται για διάφορους σκοπούς, όπως είναι η διαχείριση των δεδομένων, γραφήματα, σχηματικές απεικονίσεις των δεδομένων, προσομοιώσεις και παλινδρομική ανάλυση.



Εικόνα 5. Γραφικό περιβάλλον στατιστικού πακέτου STATA/SE.

Μετά την καταγραφή των προς μελέτη δεδομένων σε excel και συγκεκριμένα τη συλλογή και ομαδοποίηση τους, κατασκευάστηκε κώδικας – εντολές, ο οποίος έδινε αποτελέσματα των δεδομένων και των αποτελεσμάτων σε πίνακες και μεθόδους γραφικής αναπαράστασης. Παρακάτω φαίνονται επιγραμματικά τα στατιστικά βήματα. Ο κώδικας είναι ο εξής:

-έύρεση του OR (odds ratio), του logOR, του se (standard error), αφού γίνει προσθήκη 0.5 (πρόσθεση 0.5) σε όλα τα δεδομένα (ad_positive, ad_negative, controls_positive, controls_negative) στην περίπτωση που κάποιο από τα δεδομένα μηδενίζει ή τον παρονομαστή ή τον αριθμητή στο OR, logOR,se. Δημιουργία του γραφήματος forest plot.

- metan ad_positive ad_negative controls_positive controls_negative,randomi or cc(0.1)
- gen logor=log((ad_positive* controls_negative) / (ad_negative * controls_positive))
- replace logor=log(((ad_positive+0.5)* (controls_negative+0.5)) / ((ad_negative+0.5) *(controls_positive+0.5))) if controls_positive==0
- gen se=sqrt(1/ ad_negative+1/ ad_positive+1/ controls_negative+1/ controls_positive)
- replace se=sqrt(1/ (ad_negative+0.5)+1/(ad_positive+0.5)+1/(controls_negative+0.5)+1/ (controls_positive+0.5)) if controls_positive ==0
- metan logor se, randomi eform
- metan logor se, randomi eform xlab (1,5,20,80,240)

-Απεικόνιση σφάλματος δημοσίευσης με το διάγραμμα ανεστραμμένου χωνιού (funnel plot), δοκιμασίες ασυμμετρίας-διάγραμμα με τον έλεγχο του Egger και του Begg.

- metabias logor se,gr(b)
- metafunnel logor se
- metabias logor se,gr(e)

-Αφαιρετική μετα-ανάλυση

- metaninf logor se,random

-Αθροιστική μετα-ανάλυση

- `metacum logor se, effect(r)graph id(study)`

-Η αθροιστική μετα-ανάλυση που αφαιρεί τη πρώτη μελέτη και δρα συμπληρωματικά της “metacum”

- `metatrend logor se`

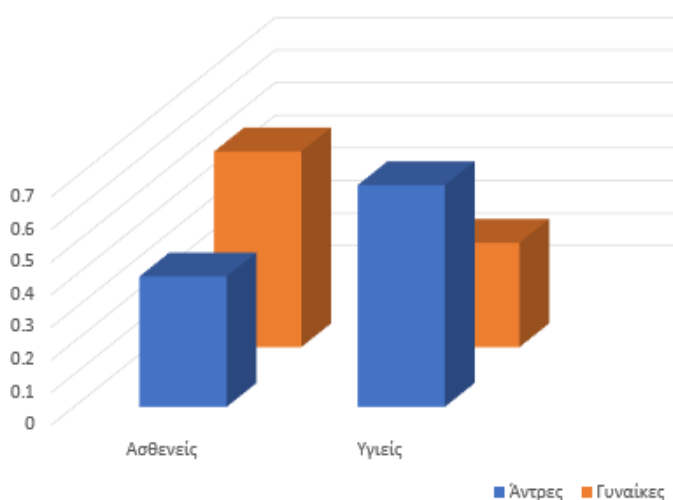
-Απεικόνιση της καμπύλης roc.

- `replace ad_negative= (ad_negative +0.5) if ad_negative==0`
- `replace ad_positive= (ad_positive+0.5) if ad_positive==0`
- `replace controls_negative=(controls_negative+0.5) if controls_negative==0`
- `replace controls_positive=(controls_positive+0.5) if controls_positive==0`
- `metandi ad_positive controls_positive ad_negative controls_negative, plot`

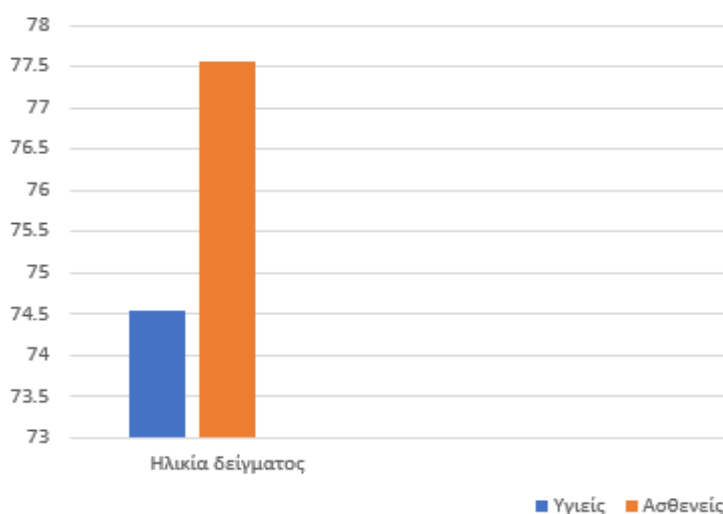
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Δημογραφικά στοιχεία

Οι προς μελέτη ομάδες ήταν δύο, οι ασθενείς που είχαν τη νόσο Alzheimer και οι υγιείς (controls) που δεν είχαν τη νόσο και προέκυψαν από πέντε συνολικά μελέτες από το 1998 έως το 2008. Συνολικά 84 ασθενείς με άνοια και 68 υγιείς- μάρτυρες. Για τους ασθενείς με άνοια ο μέσος όρος της ηλικίας τους ήταν 77,56 έτη και το 40% ήταν άρρεν. Ενώ η ομάδα των υγιών είχαν μέσο όρο ηλικίας 74,54 έτη και το 68% αυτών ήταν άνδρες. Στις εικόνες 6 και 7 απεικονίζονται αντίστοιχα τα φύλα και οι ηλικιακές ομάδες.



Εικόνα 6. Το γράφημα απεικονίζει το φύλο των συμμετεχόντων του δείγματος (ασθενείς με νόσο Alzheimer και υγιείς).



Εικόνα 7. Στο γράφημα απεικονίζεται ο μέσος όρος της ηλικίας του δείγματος.

3.2 Υπολογισμός odds ratio (OR), logOR, standard error.

Στην παρούσα εργασία για την εκτίμηση της συσχέτισης των ασθενών με Alzheimer και του μικροβίου χλαμυδόφιλα της πνευμονίας, υπολογίστηκε το odds ratio των εξής ομάδων: ασθενών με Alzheimer που είχαν μολυνθεί από το μικρόβιο (ad_positive) και αυτών που δεν είχαν μολυνθεί (ad_negative) καθώς και των μαρτύρων-υγιών ατόμων που είχαν μολυνθεί από το μικρόβιο (controls_positive) και αυτών που δεν είχαν μολυνθεί (controls_negative). Ο τύπος του odds ratio (or) είναι:

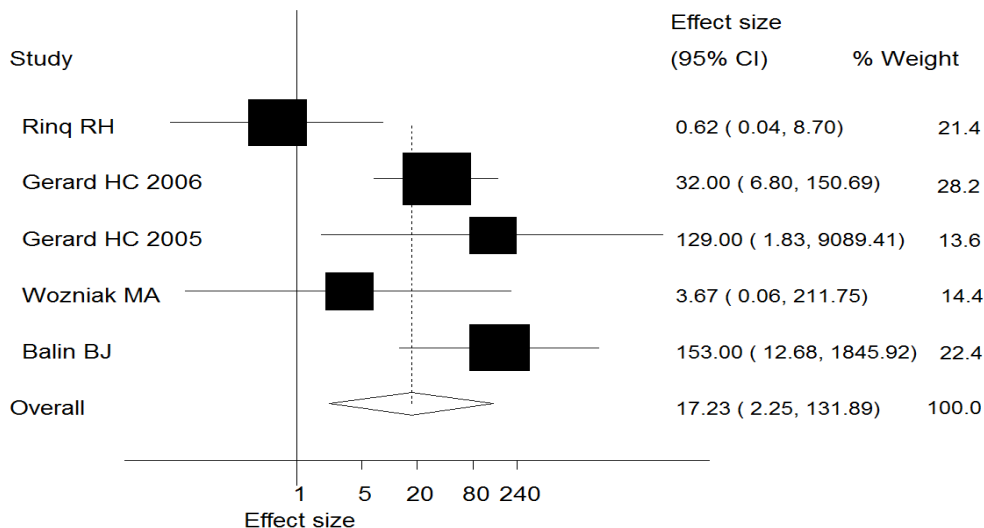
$$or = (ad_positive * controls_negative) / (ad_negative * controls_positive)$$

ΣΥΜΒΟΛΙΣΜΟΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ	ΣΥΜΒΟΛΙΣΜΟΙ
Cases without infection of Chlamydia Pn.	AD_negative
Cases infected by Chlamydia Pn.	AD_positive
Controls without infection of Chlamydia Pn	Controls_negative
Controls infected by Chlamydia Pn.	Controls_positive

Το odds ratio αναλύεται αναλόγως της σχέσης του με τη μονάδα. Δηλαδή, αν βρεθεί ίσο, μεγαλύτερο ή μικρότερο αυτής. Συγκεκριμένα, αν το OR βρεθεί ίσο με τη μονάδα τότε σημαίνει ότι και οι δυο ομάδες είναι ισοπίθανες να αποκτήσουν τη νόσο, δηλαδή η πιθανότητα να αποκτήσουν την ασθένεια, στη προκειμένη περίπτωση το Alzheimer, τα άτομα που φέρουν το μικρόβιο είναι ίση με την πιθανότητα να την αποκτήσουν αν δεν το έχουν. Αν το OR βρεθεί μεγαλύτερο της μονάδας σημαίνει ότι το βακτήριο πιθανότατα είναι παράγοντας που συσχετίζεται σημαντικά με την εμφάνιση της νόσου Alzheimer, ενώ αν βρεθεί μικρότερο της μονάδας δεν είναι παράγοντας που επηρεάζει την εμφάνιση της άνοιας. Όμως ο υπολογισμός του odds ratio αν και είναι αναγκαίος για να πραγματοποιηθεί η συσχέτιση, δεν είναι ικανός από μόνος του για την τελική ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Γι' αυτό πρέπει να υπολογιστεί και το διάστημα εμπιστοσύνης ώστε να γίνει έλεγχος αν η μονάδα εμπεριέχεται στο διάστημα εμπιστοσύνης. Αν εμπεριέχεται, τότε τα αποτελέσματα της έρευνας δεν είναι στατιστικά σημαντικά. Για αυτό λοιπόν υπολογίστηκε το διάστημα εμπιστοσύνης (CI, confidence interval) και το τυπικό σφάλμα (SE, standard error).

Πίνακας 3. Στον πίνακα παρουσιάζονται οι πέντε μελέτες της μετα-ανάλυσης, το μέγεθος επίδρασης, το διάστημα εμπιστοσύνης και το βάρος της κάθε μιας μελέτης. Η τελευταία γραμμή αντιστοιχεί στο συγκεντρωτικό αποτέλεσμα της μετα-ανάλυσης.

ΜΕΛΕΤΗ	ΜΕΓΕΘΟΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ (Odds Ratio)	ΔΙΑΣΤΗΜΑ ΕΜΠΙΣΤΟΣΥΝΗΣ	ΒΑΡΟΣ ΚΑΘΕ ΜΕΛΕΤΗΣ
Herve C. Gerard, 2006	32.000	6.795 150.690	28.16
Rinq RH,2008	0.615	0.044 8.703	21.43
Matthew A. Wozniak, 2003	3.667	0.063 211.754	14.40
Herve C. Gerard, 2005	129.000	1.831 9089.413	13.62
Balin BJ, 1998	153.000	12.681 1845.920	22.38
Μετα-ανάλυση	17.233	2.252 131.893	100.00



Εικόνα 7. Στην εικόνα απεικονίζεται το forest plot της μετα-ανάλυσης.

Στην εικόνα 7 απεικονίζεται το forest plot (ή διάγραμμα «δάσος») στο οποίο παρουσιάζονται τόσο τα αποτελέσματα των επιμέρους μελετών όσο και της μετά-ανάλυσης. Το forest plot είναι ικανό να δώσει μια σαφή και άμεση εικόνα της μετα-ανάλυσης. Στον κάθετο άξονα αντιστοιχούν οι επιμέρους μελέτες που συμπεριλήφθηκαν στη μετά-ανάλυση, ενώ στον οριζόντιο άξονα αντιστοιχεί το εκτιμώμενο μέτρο σχέσης, που στη συγκεκριμένη ανάλυση ήταν ο λόγος ασθενών-μαρτύρων. Σε κάθε μελέτη αντιστοιχεί ένα τετράγωνο, που αποτελεί το

εκτιμώμενο μέτρο σχέσης στη μελέτη αυτή, καθώς και μια οριζόντια γραμμή διαμέσου του τετραγώνου, τα άκρα της οποίας αποτελούν το διάστημα εμπιστοσύνης του μέτρου σχέσης. Έτσι, στην εικόνα 7, το τετράγωνο που αντιστοιχεί στη μελέτη Gerard et al [16] αποτελεί το μέτρο σχέσης που υπολογίστηκε στη μελέτη αυτή και είναι ίσο με 32, ενώ τα άκρα της οριζόντιας γραμμής διαμέσου του τετραγώνου αποτελούν το διάστημα εμπιστοσύνης του μέτρου σχέσης, που είναι ίσο με 6,80–150,69. Ομοίως και για τις υπόλοιπες μελέτες. Το μέγεθος των τετραγώνων εξαρτάται από το «βάρος» που προσδίδεται σε κάθε μελέτη για τον υπολογισμό του συγκεντρωτικού αποτελέσματος της μετά-ανάλυσης, με τα μεγαλύτερα τετράγωνα να αντιστοιχούν σε μελέτες που έχουν μεγαλύτερο «βάρος».

Η κάθετη γραμμή που φέρεται στην τιμή 1 στον οριζόντιο άξονα αντιστοιχεί σε $ES=1$ και αυτή η γραμμή θα τέμνεται από τις οριζόντιες γραμμές των μελετών που δεν κατέληξαν σε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ νόσου Alzheimer και βακτηρίου, δηλαδή η Ring et al [17] και η Wozniak et al [18]. Ενώ οι υπόλοιπες δεν τέμνουν τον κάθετο αυτό άξονα, άρα καταλήγουν σε στατιστικά σημαντική σχέση του βακτηρίου *Chlamydia pneumoniae* με το Alzheimer.

Το συγκεντρωτικό αποτέλεσμα της μετα-ανάλυσης απεικονίζεται με ένα διαμάντι, τα άκρα του οποίου αποτελούν το διάστημα εμπιστοσύνης του εκτιμώμενου μέτρου σχέσης. Η κάθετη γραμμή που διέρχεται από το κέντρο του διαμαντιού προς τον οριζόντιο άξονα αντιστοιχεί στην τιμή 17,23, ενώ τα άκρα του διαμαντιού αποτελούν το διάστημα εμπιστοσύνης (95% διάστημα εμπιστοσύνης: 2.52- 131.89). Η μετα-ανάλυση κατέληξε τελικά πως η σχέση του προς μελέτη βακτηρίου και της νόσου Alzheimer είναι στατιστικά σημαντική καθώς προέκυψε $P\text{-value}=0,006$ ($p < 0,05$).

3.3 Δείκτες ετερογένειας

Η ακρίβεια και η εγκυρότητα μιας μετα- ανάλυσης εξαρτώνται σημαντικά από τον βαθμό στον οποίο οι επιμέρους μελέτες είναι αρκετά ομοιογενείς μεταξύ τους, έτσι ώστε τα αποτελέσματα τους να μπορούν να συνδυαστούν για τον υπολογισμό ενός συγκεντρωτικού-τελικού αποτελέσματος. Όταν τα αποτελέσματα των επιμέρους μελετών παρουσιάζουν μεγαλύτερη ετερογένεια από εκείνη που αναμένεται εκ τύχης, τότε ο υπολογισμός ενός μόνο συγκεντρωτικού αποτελέσματος μπορεί να οδηγήσει σε λάθος συμπεράσματα. Η εντολή «metan» υπολογίζει ταυτόχρονα και τους δείκτες ετερογένειας. Οι δείκτες αυτοί παρουσιάζονται ως εξής:

-chi squared (χ^2 , χ τετράγωνο) πρόκειται για ένα τεστ στο οποίο η κατανομή του δείγματος (η αρχική μας υπόθεση) ελέγχεται εάν προσεγγίζει τον πραγματικό- γενικό πληθυσμό. Το χ τετράγωνο τεστ μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να προσδιοριστεί αν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των αναμενόμενων συχνοτήτων και των παρατηρούμενων συχνοτήτων.

- I-squared (I^2 , I τετράγωνο) της στατιστικής συνάρτησης του Higgins και Thompson, ο οποίος εκφράζει το ποσοστό της ετερογένειας, ποσοστό διακύμανσης που οφείλεται σε ετερογένεια παρά στην τύχη.

- και tau-squared (τ^2 , τ τετράγωνο), που χρησιμοποιείται όταν εφαρμόζεται το μοντέλο των τυχαίων επιδράσεων για τον υπολογισμό της ετερογένειας.

Το p-value που προκύπτει είναι 0,027 (<0,05), άρα υπάρχει ετερογένεια μεταξύ των μελετών. Στην πλειοψηφία τους οι μελέτες που ελέγχουν την ετερογένεια, ορίζουν ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας p-value μικρότερο του 0.05, έχει όμως μικρή ισχύ στο συγκεκριμένο παράδειγμα γιατί ο αριθμός των μελετών είναι μικρότερος από 30 . Ο δείκτης ετερογένειας I^2 που είναι ανεξάρτητος του αριθμού των μελετών και εκφράζεται σε εκατοστιαίο ποσοστό, βρέθηκε 63,5%, μεγαλύτερος του 50%, πράγμα που κατατάσσει τις μελέτες της μετα-ανάλυσης σε μετρίου προς μεγάλο βαθμού ετερογένεια.

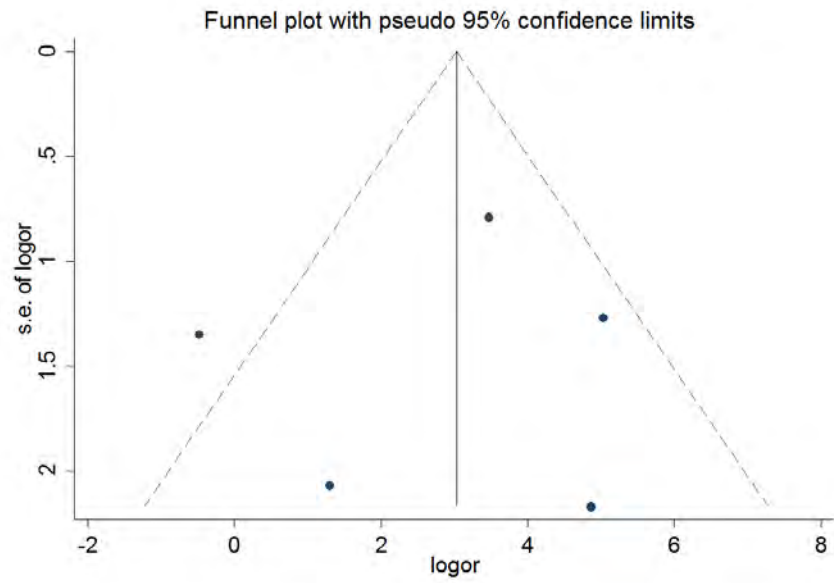
3.4 Σφάλμα δημοσίευσης

Η διενέργεια σωστής συστηματικής ανασκόπησης για ένα θέμα απαιτεί να περιλαμβάνει το σύνολο των δεδομένων όλων των διαθέσιμων πηγών (πχ. Άρθρα, μελέτες). Όμως κάτι τέτοιο δεν είναι πάντα δυνατόν, καθώς σίγουρα στην επιστημονική κοινότητα μπορεί να έχουν γίνει μελέτες που ποτέ δεν καταγράφηκαν, ή μελέτες σε γλώσσες εκτός της αγγλικής ή εκτός του πεδίου γνώσης μας ξένης γλώσσας, οι οποίες δεν συμπεριλήφθηκαν. Αποτελεί ένα κοινό πρόβλημα, το οποίο συμπεριλαμβάνεται στο επονομαζόμενο «σφάλμα δημοσίευσης» ή publication bias και συναντάται συχνά στη διεξαγωγή μιας μετα-ανάλυσης.

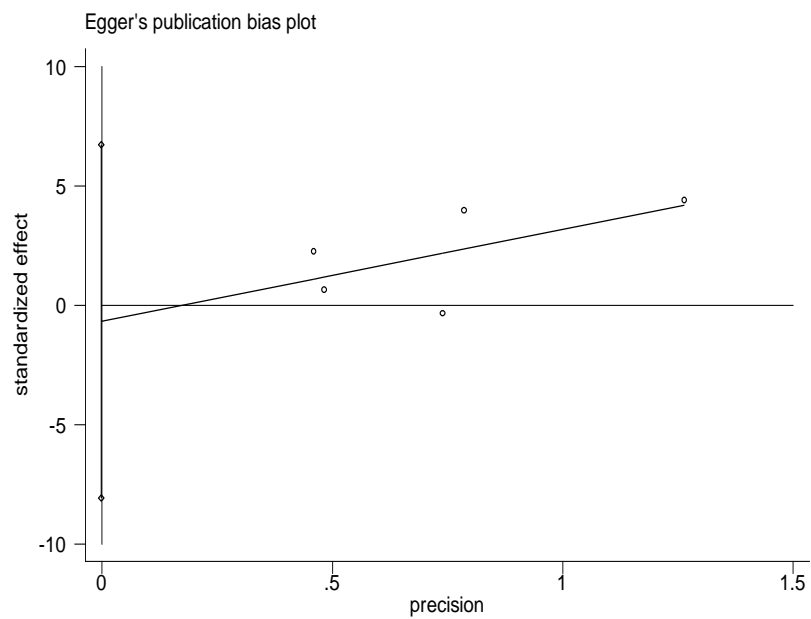
Ο εντοπισμός της ύπαρξης ή όχι συστηματικού σφάλματος δημοσίευσης (publication bias) γίνεται με το διάγραμμα funnel plot ή διάγραμμα «χωνί», το οποίο βοηθάει στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων και τονίζει τις ακραίες τιμές.

Χρησιμοποιήθηκε η εντολή “metabias” και εφαρμόστηκαν δύο μέθοδοι για αυτόν τον έλεγχο τα τεστ του Egger και το τεστ του Begg, τα γραφήματα των οποίων φαίνονται στις κάτωθι εικόνες.

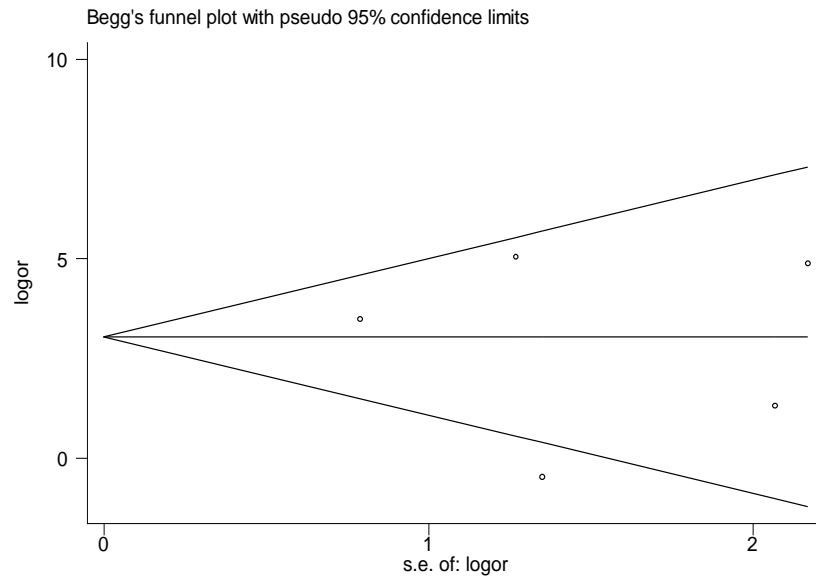
Στην εικόνα 8, δεν υπάρχει σφάλμα δημοσίευσης, τα σημεία που αντιστοιχούν στις διάφορες μελέτες δημιουργούν την οπτική απεικόνιση ενός συμμετρικού ανεστραμμένου κώνου ή χωνιού. Οι μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό συμμετεχόντων βρίσκονται στη κορυφή του ανεστραμμένου χωνιού και χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη ακρίβεια, με τις τιμές του εκτιμώμενου μέτρου σχέσης να μην παρουσιάζουν μεγάλη διασπορά, ενώ οι μελέτες με μικρότερο αριθμό συμμετεχόντων βρίσκονται στο κάτω μέρος του ανεστραμμένου χωνιού και χαρακτηρίζονται από μικρότερη ακρίβεια, με τις τιμές του μέτρου σχέσης να παρουσιάζουν μεγαλύτερη διασπορά [19].



Εικόνα 8. Το γράφημα funnel plot για την ανίχνευση συστηματικού σφάλματος δημοσίευσης.



Εικόνα 9. Το γράφημα που προκύπτει από τον έλεγχο του Egger. (Egger's plot)

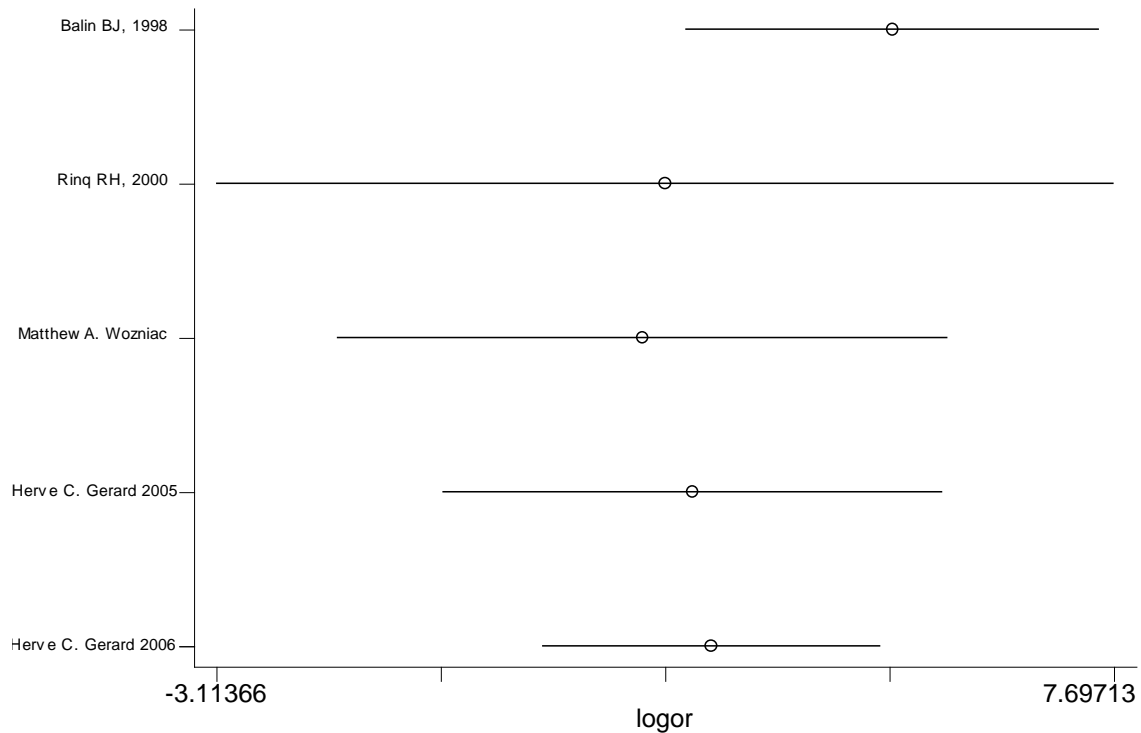


Εικόνα 10. Το γράφημα που προκύπτει από τον έλεγχο του Begg. (Begg's plot)

Οι μελέτες παρουσιάζονται ομοιόμορφα κατανεμημένες στα τρία γραφήματα (εικόνα 8, 9 και 10). Το αποτέλεσμα των ελέγχων έδειξαν πως δεν υπάρχει ένδειξη για συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης, καθώς του Begg είχε $p\text{-value}=1$ και του Egger είχε $p\text{-value}=0,781 (>0,05)$,

3.5 Αθροιστική μετά-ανάλυση

Η αθροιστική μετά- ανάλυση (cumulative meta-analysis), που εισήχθη σαν όρος το 1993 [20], στην αρχή διεξάγει τη μετά-ανάλυση της πρώτης μελέτης, έπειτα προστίθεται η δεύτερη μελέτη και τώρα διεξάγεται η μετά-ανάλυση με τις δυο μελέτες. Έπειτα προστίθενται η τρίτη μελέτη και διεξάγεται η μετά-ανάλυση με τις τρεις μελέτες και αυτό συμβαίνει διαδοχικά για όλες τις μελέτες. Οι μελέτες κατατάσσονται σε χρονολογική σειρά και έτσι απεικονίζεται το πόσο επηρεάζει το συνολικό αποτέλεσμα μια μελέτη μετά την προσθήκη της στην μετά-ανάλυση σε συνάρτηση με το χρόνο. Στη γραφική παράσταση εντοπίζονται επιπλέον και οι διάφορες αποκλείσεις του odds ratio που υπάρχουν στην πάροδο του χρόνου, συγκεκριμένα παρατηρείται μικρή μετατόπιση του odds ratio Η εντολή που χρησιμοποιείται είναι η "metacum".

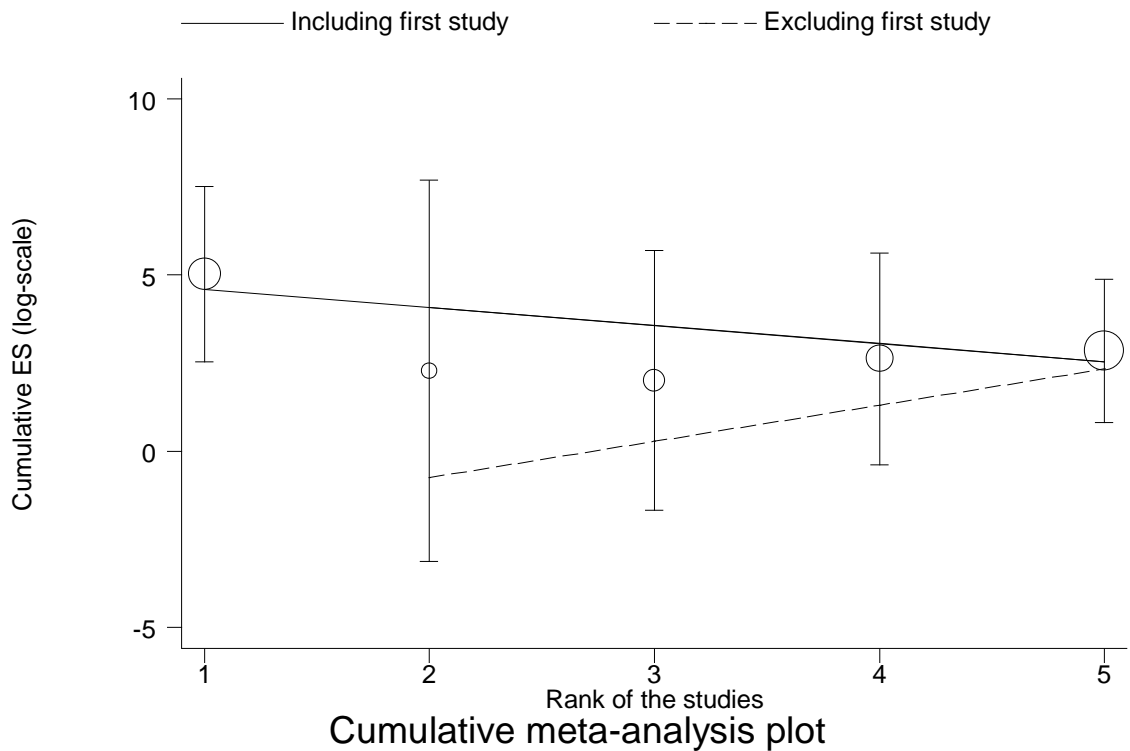


Εικόνα 11. Στην εικόνα απεικονίζεται το γράφημα της αθροιστικής μετα-ανάλυσης, όπου το συνολικό αποτέλεσμα μιας μετα-ανάλυσης υπολογίζεται με τη διαδοχική προσθήκη των μελετών σύμφωνα με τη χρονιά δημοσίευσης.

Παράλληλα η αθροιστική μετα-ανάλυση εξυπηρετεί στο να προστίθενται αποτελέσματα μιας νέας μελέτης- επιστημονικής υπόθεσης στην ήδη υπάρχουσα μετα- ανάλυση, με σκοπό τον υπολογισμό ενός νέου συγκεντρωτικού αποτελέσματος με ακόμη πιο ακριβή και έγκυρο τρόπο.

Κατά την εκτέλεση της “metacum” στον υπολογισμό του συνολικού μεγέθους επίδρασης της αθροιστικής μετά-ανάλυσης υπολογίζονται πάντα τα δεδομένα της πρώτης μελέτης. Αρκετές φορές όμως αν η πρώτη μελέτη έχει πολύ στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα, επηρεάζονται και οι υπόλοιπες μελέτες. Για αυτό αφαιρείται η πρώτη μελέτη από τις συνολικές μελέτες και με αυτό τον τρόπο μπορούμε να συγκρίνουμε το συνολικό αποτέλεσμα με ή χωρίς την πρώτη μελέτη. Από το τελικό αποτελέσματα συμπεραίνουμε, κατά πόσο η πρώτη μελέτη δημιουργεί συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης , πράγμα που επιβεβαιώνεται από τη παρούσα γραφική παράσταση. Η αθροιστική μετά-ανάλυση που αφαιρεί τη πρώτη μελέτη και δρα συμπληρωματικά και επικουρικά της εντολής “metacum” είναι η “metatrend”.

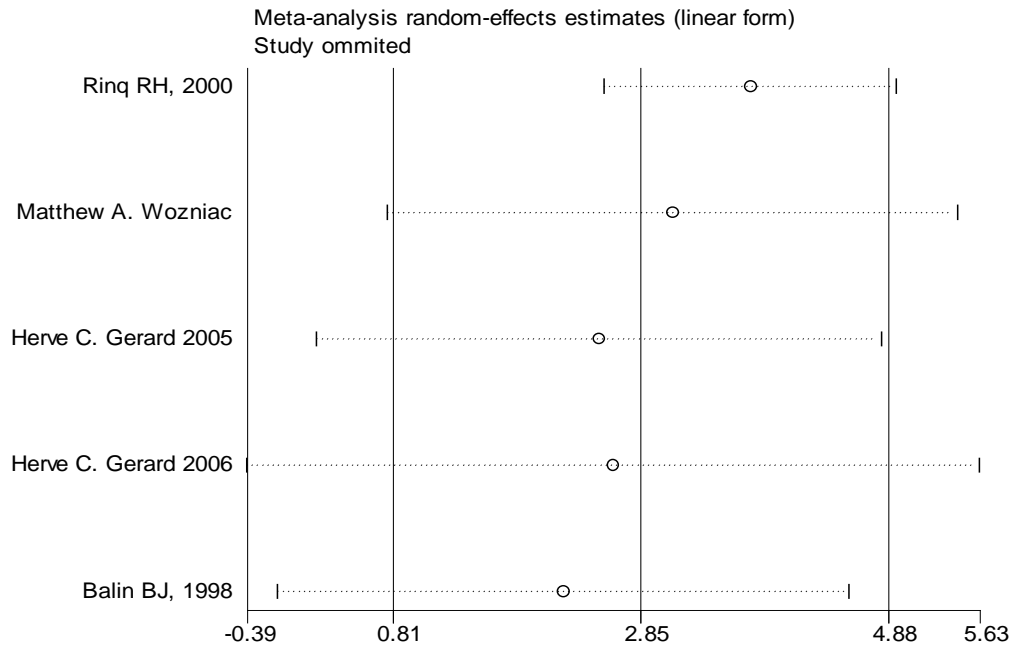
Η στατιστική ανάλυση που πραγματοποιείται από την εντολή “metatrend” μας δίνει στοιχεία για την ύπαρξη διαχρονικής τάσης (trend) στους εκτιμητές. Αυτό επιτυγχάνεται από την τιμή του p-value, η οποία αν είναι κάτω από 0,05 τότε υπάρχει διαχρονική τάση στις μελέτες.



Εικόνα 12. Το αποτέλεσμα της εντολής “metatrend”. Η κλίση της ευθείας αντικατοπτρίζει την ύπαρξη διαχρονικής τάσης.

3.6 Αφαιρετική μετά-ανάλυση

Η αφαιρετική μετά-ανάλυση χρησιμοποιείται για να διαπιστωθεί πόσο επηρεάζει η κάθε μελέτη ξεχωριστά το συνολικό αποτέλεσμα της μετά-ανάλυσης. Αυτό πραγματοποιείται με την απομάκρυνση μιας μελέτης κάθε φορά από το σύνολο των μελετών για να γίνει διεξαγωγή μετά-ανάλυσης με τις υπόλοιπες μελέτες. Η τελική παρουσίαση των αποτελεσμάτων είναι ικανή να εντοπίσει μελέτες, οι οποίες αν συμπεριληφθούν σε μια μετά-ανάλυση αλλάζουν άρδην το αποτέλεσμα. Η εντολή που χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση της αφαιρετικής μετά-ανάλυσης είναι η «metainf».



Εικόνα 13. Το γράφημα της εντολής «metaninf». Στο διάγραμμα φαίνεται στα αριστερά η μελέτη που αφαιρείται κάθε φορά και η τιμή που δείχνει ο μικρός κύκλος είναι το νέο odds ratio το οποίο έχει προκύψει χωρίς αυτή τη μελέτη.

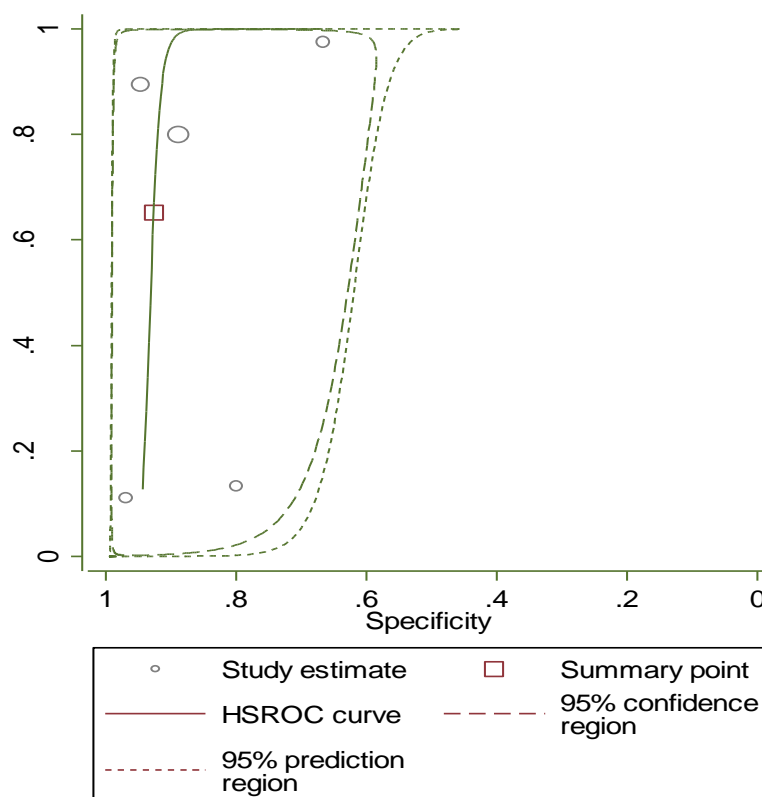
Παρατηρείται πως αλλάζει η στατιστική σημαντικότητα του αποτελέσματος με αφαίρεση κάθε μιας από τις μελέτες, φαινόμενο που ίσως δικαιολογείται από τον μικρό αριθμό των μελετών.

3.7 ROC ανάλυση

Το 2001 οι Rutter και Gatsonis παρουσίασαν το HSROC μοντέλο, μια Bayesian Hierarchical παλινδρομική προσέγγιση, βασισμένη στην ordinal regression, με κύριο πλεονέκτημα να μπορεί να διαχειρίζεται διαφορετικά thresholds για κάθε μελέτη [21], αντιμετωπίζοντας το μέχρι τώρα πρόβλημα των διαφορετικών thresholds- κατωφλίων που ήταν πάντα μια από τις μεγαλύτερες πηγές ετερογένειας στις ROC προσεγγίσεις. Το HSROC μοντέλο συνδυάζει ευαισθησία και ειδικότητα λαμβάνοντας υπ' όψιν και την μεταβλητότητα μέσα στην μελέτη αλλά και μεταξύ των μελετών.

Ο Harbord και οι συνεργάτες του το 2007 μελέτησαν την σχέση μεταξύ της παραμετροποίησης που χρησιμοποιήθηκε στο HSROC και στην bivariate διωνυμική-Γκαουσιανή μεταναλυτική προσέγγιση. Οι συγγραφείς αγνόησαν την Bayesian δομή του αρχικού HSROC μοντέλου και επικεντρώθηκαν στην παραμετροποίηση της κατανομής των επιδράσεων των (θ_i, α_i). Έτσι, δημιουργήθηκε ένας πίνακας μετασχηματισμού ο οποίος αλλάζει από τις συντεταγμένες του bivariate μοντέλου (logitsens, logitspec) στις συντεταγμένες του

HSROC μοντέλου(cut-off σημείο και ακρίβεια). Ο πίνακας αυτός δεν είναι ορθογώνιος και όταν σχεδιάζονται στον σύστημα του bivariate μοντέλου (logit-ROC σύστημα) οι άξονες δεν είναι κάθετοι μεταξύ τους [22, 23].



Εικόνα 14. Στην παραπάνω εικόνα αντικατοπτρίζεται η HSROC καμπύλη με τις πέντε μελέτες ως κουκίδες.

Κάθε κύκλος στην εικόνα 14 αποτελεί την μεμονωμένη εκτίμηση κάθε μελέτης(πέντε όσες και οι μελέτες) και δείχνει την παρατηρούμενη ευαισθησία και ειδικότητα για την κάθε μια. Το μέγεθος του κύκλου είναι ανάλογο του αριθμού των ατόμων που συμμετέχουν στη μελέτη αυτή. Ως HSROC καμπύλη καταγράφεται η συνολική καμπύλη από το μοντέλο HSROC. Το summary point που απεικονίζεται ως τετράγωνο φέρει τις συνοπτικές τιμές ευαισθησίας και ειδικότητας. Περιοχή εμπιστοσύνης 95% αναφέρεται στο συνοπτικό σημείο λειτουργίας και η περιοχή πρόβλεψης 95% πρόκειται για περιοχή εμπιστοσύνης για πρόβλεψη της πραγματικής ευαισθησίας και προδιαγραφή σε μια μελλοντική μελέτη. Συγκεκριμένα, η συνολική ευαισθησία ήταν 65% με 95% διάστημα εμπιστοσύνης (CI) 7%-97% και η συνολική ειδικότητα ήταν 92% με 95 CI 82%-97%.

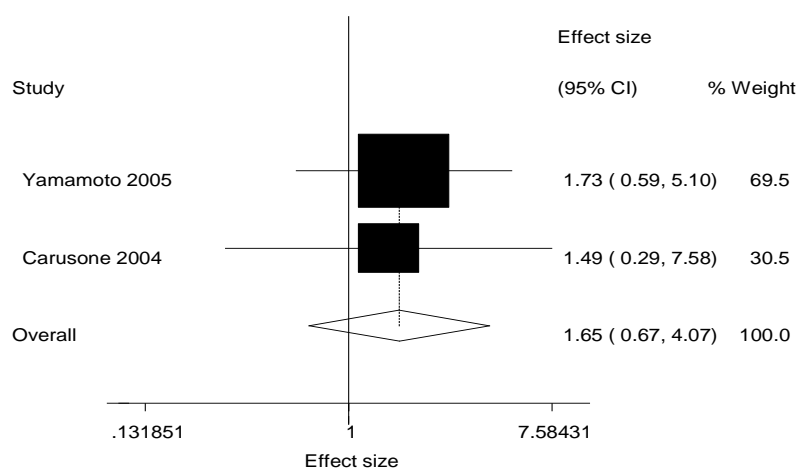
Στην παραπάνω καμπύλη απεικονίζεται η αναλογία των ψευδώς θετικών περιπτώσεων (1-specificity) στον άξονα x και της ευαισθησίας στον άξονα y για όλες τις τιμές που παρατηρούμε στο δείγμα. Στόχος μιας τέτοιας απεικόνισης είναι να βρεθεί ένα σημείο διαχωρισμού (cut-off point) πέρα από το οποίο θεωρούμε ότι το τεστ είναι θετικό. Σημεία στην άνω αριστερή γωνία

του διαγράμματος αποτελούν τιμές κατάλληλες για σημεία διαχωρισμού, καθώς έχουν χαμηλό αριθμό ψευδώς θετικών περιπτώσεων και υψηλή ευαισθησία.

3.8 Συσχέτιση της αγγειακής άνοιας με το *Chlamydia pneumoniae*

Κατά τη χρονοβόρα διαδικασία της συστηματικής ανασκόπησης στην παρούσα διπλωματική, παρατηρήθηκε αναφορά σε πιθανή συσχέτιση του μικροβίου με την αγγειακή άνοια. Έτσι γίνεται μια γρήγορη ανάλυση των υπάρχοντων δεδομένων, ελπίζοντας σε μετέπειτα εμπλουτισμό της μικρής υπάρχουσας έρευνας. Από τη συνολική βιβλιογραφία βρέθηκαν τρία άρθρα που μελετούσαν ανοσοιστοχημικά (με ELISA) τα IgG και IgA αντισώματα του *Chlamydia pneumoniae* στον ορό αίματος ασθενών μαρτύρων. Το ένα εξ αυτών απορρίφθηκε καθώς υπολόγιζε συνεχείς τιμές των IgG και IgA. Τα άλλα δύο άρθρα υπολόγιζαν διχοτόμες μεταβλητές για τα αντισώματα και ήταν αυτά από τα οποία έγινε η συλλογή δεδομένων.

Η συλλογή αφορούσε 59 ασθενείς με αγγειακή άνοια και 56 υγιείς, από αυτούς 61,17% ήταν άνδρες με αγγειακή άνοια και μέση ηλικία τα 77 έτη και 53% υγιείς άνδρες με μέση ηλικία τα 77 έτη. Παρακάτω παρουσιάζεται το forest plot για αυτές τις δύο μελέτες, καθώς τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης.



Εικόνα 15. Στην εικόνα απεικονίζεται το forest plot της μετα-ανάλυσης για τη συσχέτιση της αγγειακής άνοιας με το *Chlamydia pneumoniae*.

Πίνακας 4. Στον πίνακα παρουσιάζονται οι δύο μελέτες της μετα-ανάλυσης, το μέγεθος επίδρασης, το διάστημα εμπιστοσύνης και το βάρος της κάθε μιας μελέτης. Η τελευταία γραμμή αντιστοιχεί στο συγκεντρωτικό αποτέλεσμα της μετα-ανάλυσης.

ΜΕΛΕΤΗ	ΜΕΓΕΘΟΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ (Odds Ratio)	ΔΙΑΣΤΗΜΑ ΕΜΠΙΣΤΟΣΥΝΗΣ	ΒΑΡΟΣ ΚΑΘΕ ΜΕΛΕΤΗΣ
Yamamoto, 2005	1.733	0.590 5.095	69.52
Carusone, 2004	1.489	0.292 7.584	30.48
Μετα- ανάλυση	1.655	0.674 4.066	100.00

Το $p\text{-value} = 0.272 (>0,05)$ της μετα-ανάλυσης έδειξε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ της αγγειακής άνοιας και του μικροβίου. Επιπλέον, ο δείκτης ετερογένειας είχε $p\text{-value} = 0.879 (>0,05)$, επομένως δεν υπάρχει ετερογένεια μεταξύ των δύο μελετών. Ωστόσο, περισσότερες μελέτες απαιτούνται για τη διερεύνηση της συσχέτισης της αγγειακής άνοιας και του μικροβίου.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα διπλωματική επιχειρήθηκε η συστηματική ανασκόπηση και μετέπειτα η ανάλυση των συνολικών δεδομένων των μελετών για την σχέση τόσο της άνοιας-Alzheimer με το μικρόβιο *Chlamydia pneumoniae* όσο και της αγγειακής άνοιας. Ο όγκος των άρθρων για αποτέλεσμα που να μπορεί να προσαρμοστεί στο γενικό πληθυσμό μπορεί να κριθεί ως μικρός και ελλιπής. Παρά ταύτα ίσως αποτελέσει την αρχή για νέες έρευνες στο πεδίο της αιτίας της άνοιας, και ταυτόχρονα είναι μια καλή ευκαιρία τα παρόντα δεδομένα να χρησιμοποιηθούν για την προσθήκη των τυχών καινούργιων ερευνών.

Έως σήμερα οι κλινικές δοκιμές και οι έρευνες που έχουν διεξαχθεί για την παθογένεση του Alzheimer έχουν σαν αποτέλεσμα να δημιουργούνται πολλές αντιφωνίες στην παγκόσμια ερευνητική κοινότητα χωρίς να υπάρχει μια σαφής και αποδεκτή θεωρία. Αυτό το πρόβλημα καταδεικνύει και τον λόγο μη ύπαρξης φαρμακευτικής θεραπείας που να τροποποιεί την πορεία της άνοιας ή να την αντιμετωπίζει. Στη παγκόσμια βιβλιογραφία την τελευταία εικοσαετία θα διαβάσει κανείς πληθώρα ερευνών που εξετάζουν τη σχέση του Alzheimer τόσο με βακτήρια όπως το *Chlamydia pneumoniae*, σπειροχαίτες, όσο και με ιούς, όπως HSV-1. Οι έρευνες είναι τόσο αντιφατικές μεταξύ τους, κάποιες αναφέρουν συσχέτιση των δυο παραγόντων και κάποιες ρητά για απουσία. Παρά ταύτα το καίριο ερώτημα είναι αν τα βακτήρια ή οι ιοί εμπλέκονται στην πορεία της νόσου, αν αποτελούν συνέπεια της (δηλαδή αν οι ασθενείς με άνοια είναι πιο ευάλωτοι) ή αν απλά είναι μια τυχαία συνύπαρξη. Την απάντηση θα την δώσουν οι πολλαπλές έρευνες όχι μεμονωμένα αλλά συνδυαστικά μέσω μεγάλων μετα-αναλύσεων.

Η μετα-ανάλυση των πέντε μελετών έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ του μικροβίου *Chlamydia pneumoniae* και της νόσου Alzheimer ($p\text{-value}=0,006$). Συγκεκριμένα, το DNA των χλαμυδίων της πνευμονίας σε ασθενείς με Alzheimer ανευρίσκεται 17 φορές περισσότερο σε σχέση με αυτούς που δεν πάσχουν από τη νόσο. Το αποτέλεσμα αυτό ενισχύεται καθώς δεν υπάρχει σφάλμα δημοσίευσης. Τέλος, η μικρή μετα-ανάλυση για την αγγειακή άνοια και το *Chlamydia pneumoniae*, ανέδειξε μια μη στατιστικά σημαντική σχέση ($p\text{-value} = 0.272$).

Εάν ενισχυθεί ο ισχυρισμός της συσχέτισης μας, του Alzheimer- *Chlamydia pneumoniae*, τότε ο μικροβιακός παράγοντας θα αντιμετωπίζεται εγκαίρως με αντιμικροβιακά φάρμακα και θα μειωθεί κατά πολύ το υπέρογκο κόστος θεραπείας της άνοιας αλλά θα βελτιωθεί και η ποιότητα ζωής των ασθενών. Αν αναλογιστεί κανείς παρόμοιες περιπτώσεις όπου ο αιτιολογικός παράγοντας ήταν μικρόβιο, όπως το *H.Pylori* στο στομάχι που ευθύνεται για το έλκος και μετέπειτα για τον καρκίνο του στομάχου και προλαμβάνεται με τη θεραπεία με αντιβίωση, θα καταλάβει την αξία της παρούσης προσπάθειας μιας ανάλογης συσχέτισης. Ίσως στους

παράγοντες κινδύνου πρόκλησης της νόσου Alzheimer προστεθεί και ένας τροποποιήσιμος παράγοντας, όπως αυτός της λοίμωξης από *Chlamydia pneumoniae*.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Burns, A. and S. Iliffe, *Alzheimer's disease*. Bmj, 2009. **338**: p. b158.
2. Αντώνιος Φ. Αντωνιάδης, Ν.Α.Μ., *Ιατρική Μικροβιολογία*. 5η ed.
3. McClane, et al., *Microbial pathogenesis: A principles-oriented approach*. 1st ed. 1999: Madison, Conn, part of Blackwell Science Inc. Fence Creek Publishing.
4. Finlay, B.B. and S. Falkow, *Common themes in microbial pathogenicity revisited*. Microbiol Mol Biol Rev, 1997. **61**(2): p. 136-69.
5. Everett, K.D., R.M. Bush, and A.A. Andersen, *Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms*. Int J Syst Bacteriol, 1999. **49 Pt 2**: p. 415-40.
6. Boman, J., C.A. Gaydos, and T.C. Quinn, *Molecular diagnosis of Chlamydia pneumoniae infection*. J Clin Microbiol, 1999. **37**(12): p. 3791-9.
7. Ιωάννης Λογοθέτης and Ι. Μυλωνάς, *Νευρολογία Λογοθέτη*. 4η ed. 2004: University Studio Press.
8. Mann, D.M.A., D. Neary, and H. Testa, *Color atlas and text of adult dementias*. 1994, London: Mosby-Wolfe.
9. Leon, M.J.d., *An Atlas of Alzheimer's Disease*. 1999, London: The Pantheon Publishing group.
10. S., G., *Clinical Diagnosis and management of Alzheimer's Disease*. 2001, London: Martin Duniz.
11. Humphrey P. Rang, et al., *Φαρμακολογία*. 5η ed. 2007: Παρισιάνου Α.Ε.
12. Iadecola, C., *The pathobiology of vascular dementia*. Neuron, 2013. **80**(4): p. 844-66.
13. Shima, K., G. Kuhlenbaumer, and J. Rupp, *Chlamydia pneumoniae infection and Alzheimer's disease: a connection to remember?* Med Microbiol Immunol, 2010. **199**(4): p. 283-9.
14. Bagos, P.G., G. Nikolopoulos, and A. Ioannidis, *Chlamydia pneumoniae infection and the risk of multiple sclerosis: a meta-analysis*. Mult Scler, 2006. **12**(4): p. 397-411.
15. Turkel, Y., et al., *Is there a relationship between Parkinson's disease and Chlamydia pneumoniae?* Niger J Clin Pract, 2015. **18**(5): p. 612-5.
16. Gerard, H.C., et al., *Chlamydia (Chlamydia) pneumoniae in the Alzheimer's brain*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2006. **48**(3): p. 355-66.
17. Ring, R.H. and J.M. Lyons, *Failure to detect Chlamydia pneumoniae in the late-onset Alzheimer's brain*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(7): p. 2591-4.
18. Wozniak, M.A., et al., *Absence of Chlamydia pneumoniae in brain of vascular dementia patients*. Neurobiol Aging, 2003. **24**(6): p. 761-5.
19. Γαλάνης, Π. *Συστηματική ανασκόπηση και μετα-ανάλυση*. 2008.
20. Chalmers, T.C. and J. Lau, *Meta-analytic stimulus for changes in clinical trials*. Stat Methods Med Res, 1993. **2**(2): p. 161-72.
21. Dukic, V. and C. Gatsonis, *Meta-analysis of diagnostic test accuracy assessment studies with varying number of thresholds*. Biometrics, 2003. **59**(4): p. 936-46.
22. Harbord, R.M., et al., *A unification of models for meta-analysis of diagnostic accuracy studies*. Biostatistics, 2007. **8**(2): p. 239-51.
23. Βασιλείου, Β., *Σύγκριση μονοπαραγοντικής, ROC ΚΑΙ διμεταβλητής ανάλυσης και εφαρμογή σε πραγματικά ιατρικά δεδομένα*, in *Σχολή εφαρμοσμένων μαθηματικών και φυσικών επιστημών*. 2012, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο: Αθήνα.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

Αναζήτηση άρθρων στην βιβλιογραφική βάση δεδομένων PubMed, με το εξής ερώτημα:
chlamydia AND (alzheimer OR dementia).

ΣΥΓΓΡΑΦΕΙΣ	ΕΤΟΣ	PMID	ΑΠΟΔΕΚΤΟ/ ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ
Judith Miklossy, Patrick L. McGeer	2016	26961231	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (συσχέτιση Alzheimer και ΣΔ τύπου II)
Charles Lim, Christine J Hammond, Susan T. Hingley, Brian J. Balin	2014	25540075	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (In vitro διαδικασία, κυτταροκαλλιέργειες)
Eileen Roulis , Nathan L. Bachmann , Garry S.A. Myers , Wilhelmina Huston , James Summersgill , Alan Hudson , Ute Dreses-Werringloer , Adam Polkinghorne, Peter Timms	2015	26420648	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (Γονιδιωματική ανάλυση απομονωμένων μολυσμένων κυττάρων με Crp)
Claire Roubaud Baudron, Christine Varon, Francis Mégraud, Nathalie Salles	2015	26707559	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (υπόθεση παθογενετικού μηχανισμού)
Omura Y, Lu D, Jones MK, Nihrane A, Duvvi H, Shimotsuura Y, Ohki M.	2015	26829843	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (αυτισμός και Crp)
Omura Y1, Chen Y, Lermann O, Jones M, Duvvi H, Shimotsuura Y.	2010	21319603	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (μελέτη για Chlamydia Trachomatis)
H. W. Doerr ,J. Cinatl	2012	22033658	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (αναδρομική μελέτη)
Eoin E. Kelly, Conor P. Horgan and Mary W. McCaffrey1	2012	23176481	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (μελέτη Rab πρωτεϊνών)
Christopher S. Little, Timothy A. Joyce, Christine J. Hammond, Hazem Matta, David Cahn, Denah M. Appelt, Brian J. Balin	2014	25538615	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (Σε ποντίκια ανίχνευση αντιγόνων)
James D. Weinstein, Edgar R. Gonzalez, Richard Egleton, David Allen Hunt	2013	23835462	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (πρωτόκολλο φαρμακοθεραπείας στο Alzheimer)

Christine J Hammond ^{1,3} , Loretta R Hallock ¹ , Raymond J Howanski ¹ , Denah M Appelt ^{2,3} , C Scott Little ^{1,3} , Brian J Balin ^{1,3*}	2010	20863379	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (ανοισσοστοχημική ανίχνευση anti-β-αμυλοειδή αντιγόνα και anti-Cpη αντιγόνων)
Kensuke Shima · Gregor Kuhlenbäumer · Jan Rupp	2010	20445987	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (παθογένεση σχέσης Alzheimer και Cpη)
Carlo Contini, Silva Seraceni, Rosario Cultrera, Massimiliano Castellazzi, Enrico Granieri and Enrico Fainardi	2010	20182626	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (βιβλιογραφική ανασκόπηση του ρόλου της λοίμωξης από Cpη σε διάφορες νευρολογικές παθήσεις)
Clive Holmes and Darren Cotterell	2009	19958038	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (Βιβλιογραφική ανασκόπηση του ρόλου της λοίμωξης από Cpη , καθώς και από άλλα μικρόβια ή ιούς)
Boelen E., Steinbusch HW, Bruggeman CA, Stassen FR	2009	20011709	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (παθογένεση της σχέσης Alzheimer και Cpη)
Kie Honjo ^{a,b} , Robert van Reekumb , Nicolaas P. L. G. Verhoeff	2009	19560105	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (Βιβλιογραφική ανασκόπηση του ρόλου της λοίμωξης από Cpη , καθώς και από άλλα μικρόβια ή ιούς)
Ute Dreses-Werringloera, ¹ , Mohammad Bhuiyana , Yinghao Zhao ^a , Herve´ C. Ge´rarda , Judith A. Whittum- Hudson ^a , Alan P. Hudson	2009	18829386	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (Καλλιέργειες Cpη από ιστούς εγκεφάλου με AD.)
Mehrouz Dezfulian ^{a,*} , Mohammad Ali Shokrgozar ^b , Soroush Sardari ^c , Kazem Parivar ^a , Gholamreza Javadi	2008	18701222	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (παθογένεση της σχέσης Alzheimer και Cpη)
Guitierrez F, Masia M.	2008	18582147	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (Βελτίωση της ποιότητας ασθενών με πνευμονία σε οίκους ευγηρίας)
Nadedza Urosevic, Ralph Nigel Martis	2008	18487850	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (σχέση APOE-ε4 και λιπιδαιμικού μεταβολισμού)
Denah M Appelt, Maria R Roupas, Deana S Way, Marcus G Bell, Elizabeth V Albert, Christine J Hammond, and Brian J Balin	2008	18218130	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (Κύτταρα νευροβλαστώματος μολύνθηκαν με Cpη)
Bogusław Paradowski, Malgorzata Jaremkó, Tadeusz Dobosz, Jerzy Leszek, Leszek Noga	2007	17318713	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (Εμφάνιση Cpη στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό)

Nowaczyk P, Deptula W.	2006	17199102	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (μελέτη του TWAR βιοτύπου Crp)
Herve C. Gerard , Ute Dreeses-Werringloer, Kristin S. Wildt, Srilekha Deka, Cynthia Oszust, Brian J. Balin, William H. Frey II, Elizabeth Z. Bordayo, Judith A. Whittum-Hudson & Alan P. Hudson	2006	17052268	ΑΠΟΔΕΚΤΟ
Dreeses- Werringloer U, Gerard HC, Whittum-Hudson JA, Hudson AP	2006	17031241	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (Κύτταρα μολύνθηκαν με Crp)
H. Wehr, M. Bednarska-Makaruk, W. Łojkowska, A. Graban, D. Hoffman-Zacharska, A. Kuczyn ska-Zardzewiały, J. Mrugała, M. Rodo, A. Bochynska, A. Sułek,D. Ryglewicz,	2006	16645274	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (μελέτη για αγγειακή άνοια)
		16245438	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (ο ρόλος των heat shock πρωτεϊνών)
Horvath Z, Vescei L	2006	16491568	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (η σχέση του Crp σε νευρολογικές διαταραχές)
D. Franciotta, E. Zardini, R. Bergamaschi, L. M. Grimaldi, L. Andreoni, V. Cosi	2005	16146493	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (δείγματα αίματος για IgG, IgA)
Herve C. Gerarda, Kristin L. Wildta, Judith A. Whittum-Hudsona, Zongshan Laib, Joel Agerb, Alan P. Hudson	2005	15998578	ΑΠΟΔΕΚΤΟ
Hideki Yamamoto, Takuya Watanabe, Akira Miyazaki, Takashi Katagiri, Tsunenori Idei, Takashi Iguchi, Masaru Mimura and Kunitoshi Kamijima.	2005	15817002	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (Δείγματα αίματος αναλύθηκαν με ELISA για IgG, IgA)
Martinez- Moragon E., Garcia Ferrer L.	2004	15574267	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (διαφορά πνευμονίας κοινότητας και νοσοκομειακής)

Soo Chan Carusone, Marek Smieja, William Molloy, Charlie H Goldsmith, Jim Mahony, Max Chernesky, Judy Gnarpe, Tim Standish, Stephanie Smith and Mark Loeb	2004	15476562	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (αγγειακή άνοια)
T.E. Strandberg, K.H. Pitkala, K. Linnavuorri and R.S. Tilvis	2004	15207442	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (αντιμετώπιση της άνοιας σε ηλικιωμένους)
Stephen R. Robinson, Curtis Dobson, Joseph Lyons	2004	15172741	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (παθογένεση της σχέσης Alzheimer και Cpn)
R.F. Itzhaki, M.A. Wozniak, D.M. Appelt, B.J. Balin	2004	15172740	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (Βιβλιογραφική ανασκόπηση του ρόλου της λοίμωξης από Cpn)
Mark P. Mattson	2004	15163105	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (Λοιμώδεις παράγοντες και σχετιζόμενες με την ηλικία νευροεκφυλιστικές διαταραχές)
Morag Robertson	2004	15149617	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (υπόθεση συσχέτισης Alzheimer και Cpn)
C. Scott Little, Christine J. Hammond, Angela MacIntyre, Brian J. Balin, Denah M. Appelt	2004	15013562	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (Σε ποντίκια έγινε επιμόλυνση με Cpn)
Loeb MB, Molloy DW	2004	14962152	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (μελέτη φαρμάκων στο Alzheimer)
Tylewska- Wierzanowska	2002	14750263	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (επιπλοκές της χρόνιας πνευμονίας από Cpn)
Charles W. Stratton, Subramaniam Sriram	2003	14623021	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (σχέση Cpn και κεντρικό νευρικό σύστημα)
Boland JP.	2000	14619139	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (Cpn και καρδιαγγειακό σύστημα)
Matthew A. Wozniak, Ann Cookson, Gordon K. Wilcock, Ruth F. Itzhaki	2003	12927758	ΑΠΟΔΕΚΤΟ
Timo E. Strandberg, Kaisu H. Pitkala, Kimmo H. Linnavuori, Reijo S. Tilvis	2003	12920256	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (Cpn και καρδιαγγειακό σύστημα)
Ronchetti F., Ronchetti R.	2003	12806283	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (Cpn και χολοστεάτωμα)
Contini C., Fainardi E.	2003	12620657	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (Cpn και HIV)

A. MacIntyre, R. Abramov, C.J. Hammond, A.P. Hudson, E.J. Arking, C.S. Little, D.M. Appelt and B.J. Balin	2003	12584732	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (Μεταθανάτια δείγματα ανθρώπινου εγκεφάλου-μελετήθηκε η δράση του Cpn στα ενδοθηλιακά κύτταρα του εγκεφάλου.)
Bruunsgaard H.	2002	12195874	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, Cpn αντισώματα και η σχέση με τις ηλικιακές διαταραχές)
Balin BJ, Appelt DM.	2001	11794745	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (η φλεγμονή στο Alzheimer)
Yucesan C., Sriram S.	2001	11371760	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (σχέση Cpn και κεντρικό νευρικό σύστημα)
R. Woessner, J. Treib	2001	11233885	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (οι λοιμώξεις από χλαμύδια στη νευρολογία γενικά)
John E. Greenlee, M.D. and John W. Rose, M.D.	2000	11051301	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (αντιπαραθέσεις σε νευρολογικές ασθένειες)
Rinq RH., Lyons JM.	2008	10878049	ΑΠΟΔΕΚΤΟ
Blogan and partners	2014	1566292	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (το Alzheimer και η σχέση του με τα βακτήρια)
Stephenson J.	1999	10022090	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (μελέτες για διαταραχές του εγκεφάλου)
Balin BJ, Gerard HC., Arking EG., Appelt DM.	1998	9749980	ΑΠΟΔΕΚΤΟ
Mandell JL, Townsend GC	1998	9601139	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (επείγουσες νευρολογικές διαταραχές)
Clark RA, Bessinger R.	1997	9342253	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (HIV)
Brown RR., Ozaki Y., Datta SP.	1991	1722946	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (HIV)
Renvoize EB, Awad IO, Hanning MH	1987	3687571	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (επιδημιολογική μελέτη για το Alzheimer)
Jens Gieffers, Erich Reusche, Werner Solbach, Mathias Maass	2000	10655406	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (δεν ήταν case study)
Balin, Brian J., Little, C Scott, Hammond, Christine J.	2008	18487846	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (παθογένεση της σχέσης Alzheimer και Cpn)

Grayston JT1, Campbell LA, Kuo CC, Mordhorst CH, Saikku P, Thom DH, Wang SP	1990	2181028	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (παθογένεση της σχέσης Alzheimer και Cpn)
Choi Y, Kim HS, Shin KY, Kim EM, Kim M, Kim HS, Park CH, Jeong YH, Yoo J, Lee JP, Chang KA, Kim S, Suh YH.	2007	17406652	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (σχέση Alzheimer και μينوκυκλίνης)
Mamelak M.	2007	16837107	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (Alzheimer και οξειδωτικό stress)
A. MacIntyre, R. Abramov, C.J. Hammond, A.P. Hudson, E.J. Arking, C.S. Little, D.M. Appelt, and B.J. Balin	2003	12584732	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (παθογένεση της σχέσης Alzheimer και Cpn)
MacIntyre A1, Hammond CJ, Little CS, Appelt DM, Balin BJ.	2002	12480099	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (παθογένεση της σχέσης Alzheimer και Cpn)
B. T. Hyman, G. W. Van Hoesen, I- L. J. Kromer, BA and A. R. Damasio	1986	3789663	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (παθογένεση της σχέσης Alzheimer και Cpn)

Στις βιβλιογραφικές αναφορές έγινε εκ νέου ανάλυση των αναφερόμενων άρθρων, τα οποία συμπεριλαμβάνονται στον παραπάνω πίνακα.

Αναζήτηση άρθρων στην βιβλιογραφική βάση δεδομένων PubMed, με το εξής ερώτημα:
chlamydia and vascular dementia

ΣΥΓΓΡΑΦΕΙΣ	ΕΤΟΣ	PMID	ΑΠΟΔΕΚΤΟ/ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ
Bogusław Paradowski, Malgorzata Jaremkó, Tadeusz Dobosz, Jerzy Leszek, Leszek Noga	2007	17318713	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (PCR σε εγκεφαλονωτιαίο υγρό)
H. Wehr, M. Bednarska-Makaruk, W. Łojkowska, A. Graban, D. Hoffman-Zacharska, A. Kuczynska, Zardzewiały, J. Mrugała, M. Rodo, A.Bochynska, A. Sułek, D. Rylewicz	2006	16645274	ΑΠΟΔΕΚΤΟ

Hideki Yamamoto, Takuya Watanabe, Akira Miyazaki, Takashi Katagiri, Tsunenori Idei, Takashi Iguch, Masaru Mimura, and Kunitoshi Kamijima	2005	15817002	ΑΠΟΔΕΚΤΟ
Soo Chan Carusone, Marek Smieja, William Molloy, Charlie H Goldsmith, Jim Mahony, Max Chernesky, Judy Gnarpe, Tim Standish, Stephanie Smith and Mark Loeb	2004	15476562	ΑΠΟΔΕΚΤΟ
T.E. STRANDBERG, K.H. PITKALA, K. LINNAVUORI and R.S. TILVIS	2004	15207442	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (οι λοιμώξεις γενικά σε ηλικιωμένους)
Matthew A. Wozniak, Ann Cookson, Gordon K. Wilcock, Ruth F. Itzhaki	2003	12927758	ΜΗ ΑΠΟΔΕΚΤΟ (PCR σε μεταθανάτια δείγματα)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β

Το αποτέλεσμα το οποίο προκύπτει από την εκτέλεση της εντολής metatrend στο Stata.

```
. metatrend logor se

Tests for detecting trends in cumulative meta-analysis
-----

Number of studies: 5

'First vs. Subsequent' method
-----
                Effect Size (ES)    P-value    [95% Conf. Interval]
First study           32.0000         0.000         6.7952150.6941
Subsequent studies    13.7815         0.087         0.6800279.3090
All Studies           17.2332         0.006         2.2516131.8976
-----

Test for the equality of the ESs
-----

Ho: ES(first) = ES(subsequent)

z-value = 0.488
P-value = 0.626

Generalized Least Squares (GLS) Regression-based test
-----
                Coef.    Std. Err.    P-value    [95% Conf. Interval]    rho
Including all studies  -0.21279    0.17347    0.220    -0.55279    0.12722    0.210
Excluding first study  1.13006    0.06685    0.000    0.99903    1.26108   -0.582
-----
```

Το αποτέλεσμα το οποίο προκύπτει από την εκτέλεση της εντολής metandi στο Stata.

```
. metandi ad_positive controls_positive ad_negative controls_negative, plot
```

Refining starting values:

```
Iteration 0: log likelihood = -22.087385
Iteration 1: log likelihood = -21.922905 (not concave)
Iteration 2: log likelihood = -20.051153 (not concave)
Iteration 3: log likelihood = -18.958106
```

Performing gradient-based optimization:

```
Iteration 0: log likelihood = -18.958106 (not concave)
Iteration 1: log likelihood = -18.254687
Iteration 2: log likelihood = -18.017577
Iteration 3: log likelihood = -17.840161
Iteration 4: log likelihood = -17.684562
Iteration 5: log likelihood = -17.606419
Iteration 6: log likelihood = -17.599422
Iteration 7: log likelihood = -17.599409
Iteration 8: log likelihood = -17.599409
```

Meta-analysis of diagnostic accuracy

Log likelihood = -17.599409 Number of studies = 5

	Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
Bivariate					
E(logitSe)	.6276502	1.589181			-2.487088 3.742389
E(logitSp)	2.534144	.5012137			1.551783 3.516505
Var(logitSe)	10.61849	11.03471			1.385147 81.4009
Var(logitSp)	.1350365	.5294616			.0000621 293.7028
Corr(logits)	-.969204	.2557435			-1 .9999915
HSROC					
Lambda	7.757074	6.949972			-5.86462 21.37877
Theta	-3.667764	3.675148			-10.87092 3.535394
beta	-2.182403	1.897458	-1.15	0.250	-5.901352 1.536546
s2alpha	.0737532	.6074598			7.19e-09 756148
s2theta	1.17901	2.565013			.0165834 83.82266
Summary pt.					
Se	.6519565	.3605999			.0767683 .9768511
Sp	.926501	.0341311			.8251711 .9711538
DOR	23.61293	35.57247			1.23262 452.3456
LR+	8.870283	5.307427			2.745562 28.65786
LR-	.3756537	.3850235			.0503912 2.800403
1/LR-	2.662026	2.728425			.3570915 19.84473

Covariance between estimates of E(logitSe) & E(logitSp) -.253611