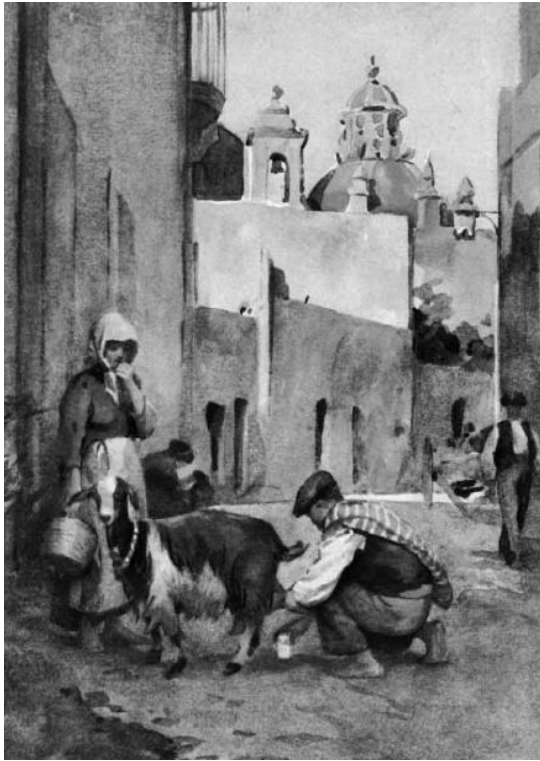


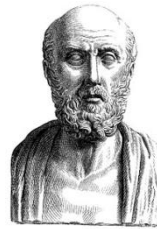


Ανθρώπινη βρουκέλλωση: ανοσολογία και κλινική πράξη



Παναγιώτης Σκένδρος
Αναπλ. Καθηγητής Παθολογίας
Α' Παθολογική Κλινική
& Εργαστήριο Μοριακής Αιματολογίας ΔΠΘ
Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αλεξανδρούπολης
www.inflathrace.gr

History.....



- **Hippocrates**, 450 BC, first clinical description, Thasos island, “*Epidemics*”
 - **Pompeii, Vesuvius eruption**, 79 AD, skeletons with bone lesions typical of brucellosis & Brucella-like bacteria in two-millennia-old cheese
 - **David Bruce**, Malta 1887, causal relationship between organism and disease
 - **Themistocle Zaimis**, 1907, as the major etiologic factor
- Brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis !!**
- **Thasos island**, a major outbreak in Greece, 55 cases, May 2008

EUROSURVEILLANCE Vol. 13 • Issues 4–6 • Apr–Jun 2008 • www.eurosurveillance.org

Rapid communications

LOCAL BRUCELLOSIS OUTBREAK ON THASSOS, GREECE: A PRELIMINARY REPORT

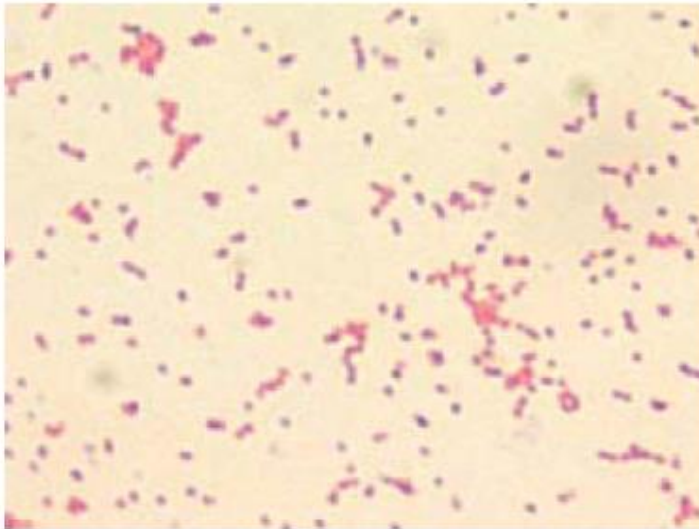
R Vorou (vorou@keelpno.gr)¹, K Gkolfinopoulou¹, G Dougas¹, K Mellou¹, IN Pierroutsakos¹, T Papadimitriou¹
1. Hellenic Center for Disease Control and Prevention, Ministry of Health and Social Solidarity, Athens, Greece

The facts-1

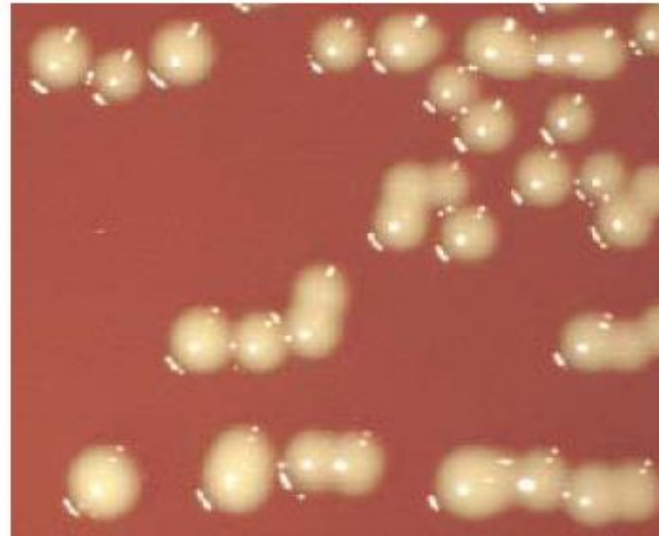
- ✓ Brucellosis is caused by **intracellular pathogens of the genus Brucella** that have domestic animals, **mainly goats, sheep and cows**, as natural reservoirs
- ✓ The disease is **transmitted to humans by consumption of unpasteurized milk and dairy products or by occupational contact with infected animals**
- ✓ Brucella is **highly infectious through aerosol route**, thus is considered as one of **the most common laboratory-acquired pathogens** and is also classified as **category B agent on the biodefense list**
- ✓ **No vaccine in humans, prolonged antibiotic treatment (2-9 months)**
- ✓ In animals live attenuated vaccines (*B. melitensis* REV-1) **potentially harmful to humans**



Brucella spp.



Gram (-)



Colonies

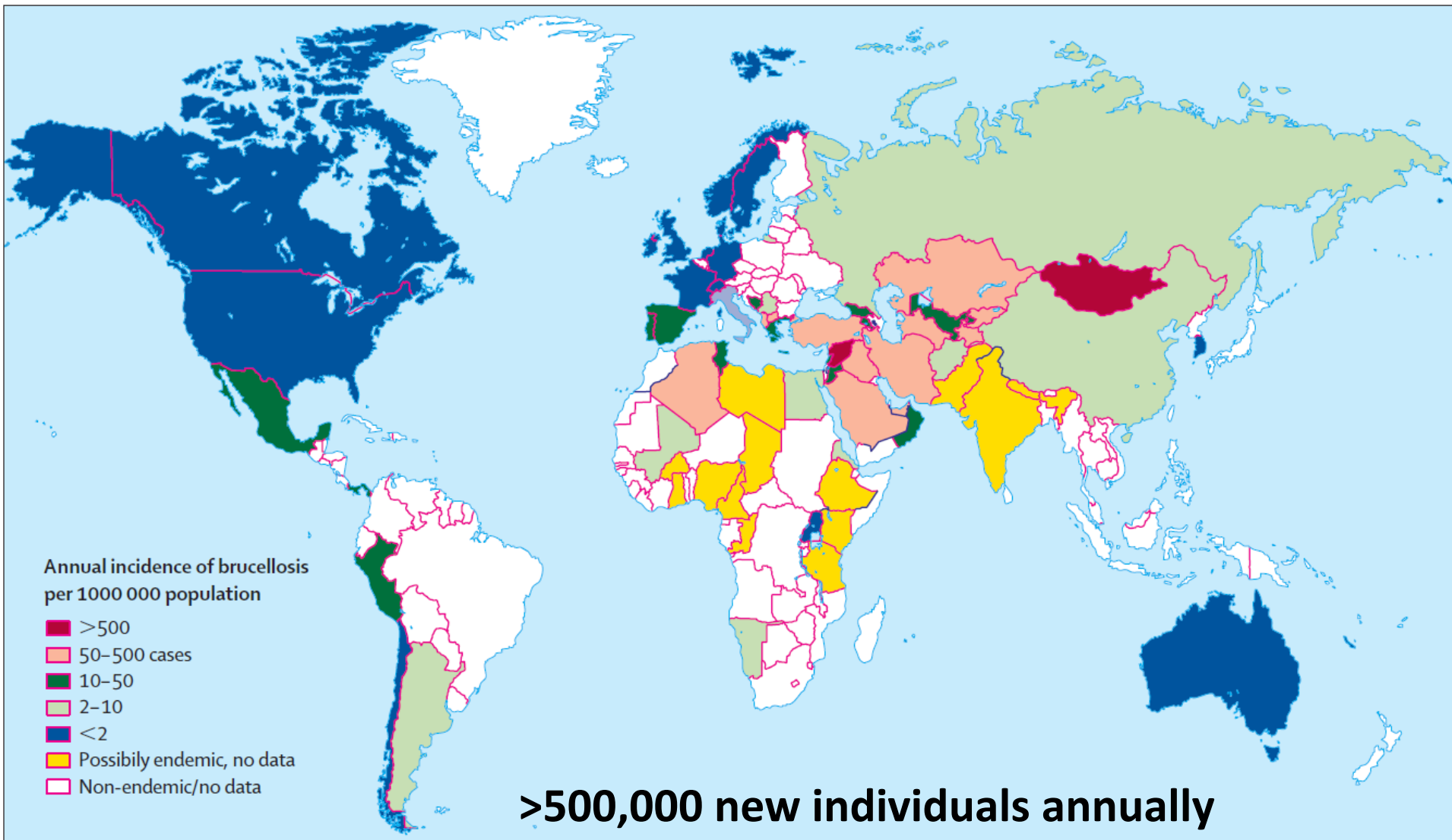
Τα είδη του γένους *Brucella* και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους

Είδος	Πρώτη περιγραφή	Κύριος φυσικός ξενιστής	Άλλοι ξενιστές	Λοίμωξη στον άνθρωπο
<i>B. melitensis</i>	Bruce, 1887	Αιγοπρόβατα	Καμήλες, βοοειδή, αντιλόπες	Ναι (70%)
<i>B. abortus</i>	Bang, 1897	Βοοειδή	Βουβάλια, τσακάλια, ύαινες, άλογα	Ναι (25%)
<i>B. suis</i>	Traum, 1914	Χοίροι	Λύκοι, αλεπούδες, τάρανδοι	Ναι (5%)
<i>B. ovis</i>	Buddle και Boyes, 1953	Πρόβατα		Όχι
<i>B. neotomae</i>	Stoenner και Lackmann, 1957	Τρωκτικά		Όχι
<i>B. canis</i>	Carmichael, 1966	Σκύλοι		Ναι (σπανιότατα)
<i>B. maris</i>	Ewalt και συν, 1994	Θηλαστικά θάλασσας		Ναι (3 περιπτώσεις)

The facts-2

- ✓ Human brucellosis **remains widespread and neglected in many areas**, including southeastern Europe, the Mediterranean basin, Asia, Central and Latin America and Africa
- ✓ Brucellosis remains **under-diagnosed and under-reported** in several endemic countries, and **an emerging zoonosis** in EU

Worldwide incidence of human brucellosis





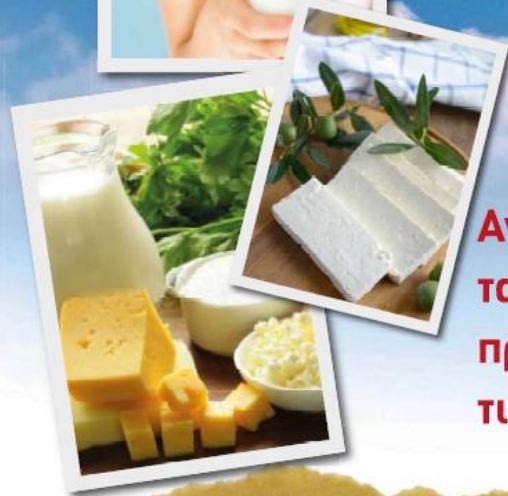
Προστασία από τον μελιταίο πυρετό

Ο μελιταίος πυρετός είναι εμπύρετο νόσημα που προκαλεί σημαντική ταλαιπωρία



ΒΡΟΥΚΕΛΛΩΣΗ

- πυρετός
- νυκτερινές εφιδρώσεις
- εύκολη κόπωση
- πόνοι στις αρθρώσεις
- θετικά εργαστηριακά αποτελέσματα



**Αγαπάμε
τα γαλακτοκομικά,
προσέχουμε
τι καταναλώνουμε!**



Παστεριωμένο ή καλά βρασμένο γάλα



Τυρί από πιστοποιημένο τυροκομείο



Προστασία του κτηνοτρόφου από τον μελιταίο πυρετό



ΒΡΟΥΚΕΛΛΩΣΗ

- πυρετός
- νυκτερινές εφιδρώσεις
- εύκολη κόπωση
- πόνοι στις αρθρώσεις
- θετικά εργαστηριακά αποτελέσματα



**Προσέχουμε τα ζώα μας!
Προστατεύουμε την υγεία μας!**

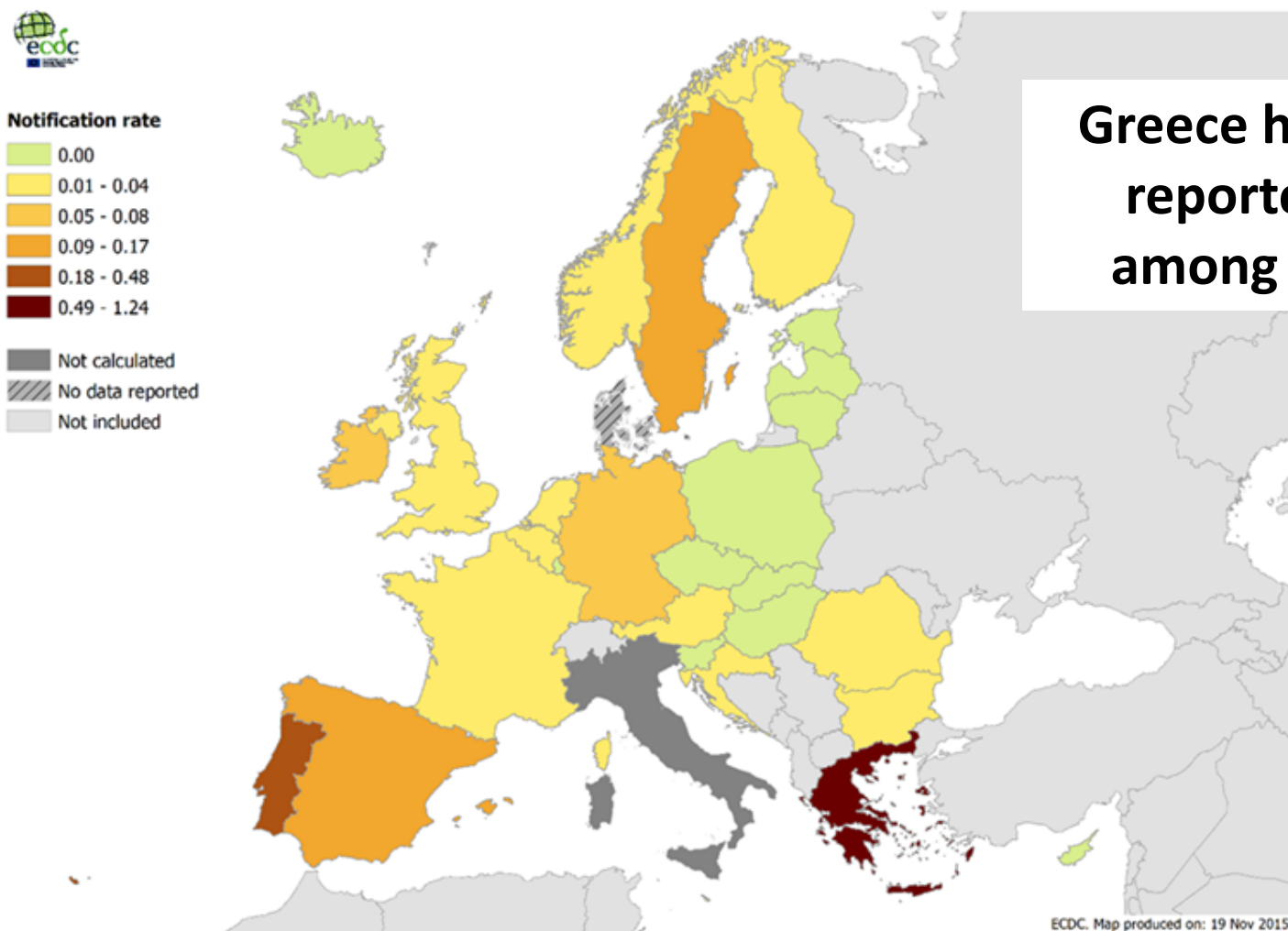


- Εμβολισμός και αιμοληψία αιγοπροβάτων/βοοειδών
- Απομόνωση νοσιστερχόμενων ζώων
- Καταστροφή πτωκόντων και νεκρών ζώων
- Ενημέρωση των Κτηνοτρόφων Αρχών σε περίπτωση επεισοδίων



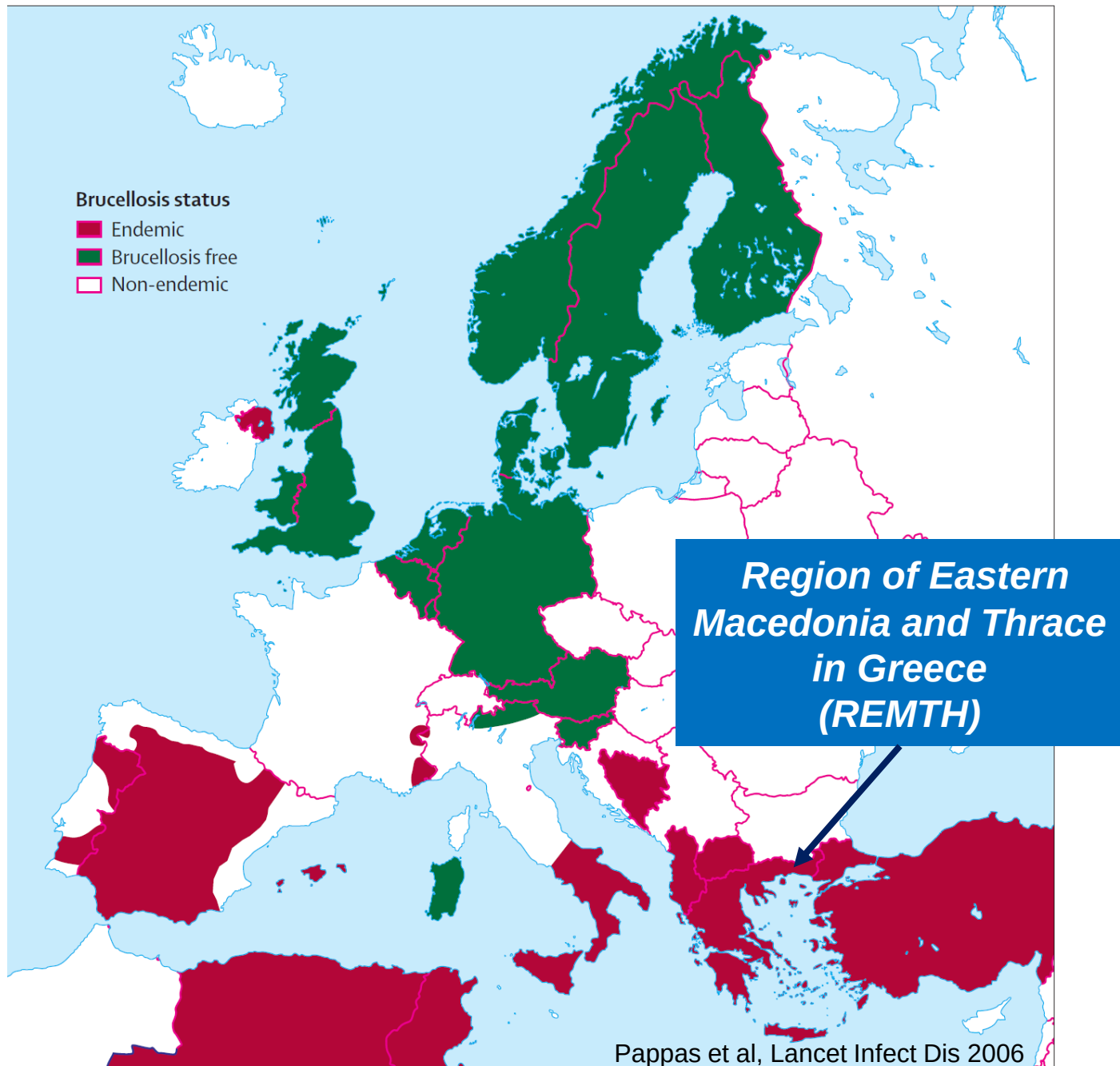
- Άδραστο γάλα και μη ελεγχμένο τυρί
- Επικοινωνία με φορέα των νεκρών ζώων, των πτωκόντων και της γεννητικής οδού των ζώων
- Παρόνομες μετακινήσεις και αγοραπωλησίες
- Συνεχίζετε με ζώα στη μη ελεγχόμενη εκμετάλλευσή τους

Figure 1. Reported confirmed brucellosis cases: rate per 100 000 population, EU/EEA, 2014



Source: Country reports from Austria, Belgium, Bulgaria, Croatia, Cyprus, the Czech Republic, Estonia, Finland, France, Germany, Greece, Hungary, Iceland, Ireland, Italy, Latvia, Lithuania, Luxembourg, Malta, the Netherlands, Norway, Poland, Portugal, Romania, Slovakia, Slovenia, Spain, Sweden, the United Kingdom.

The REMTH represents an endemic area



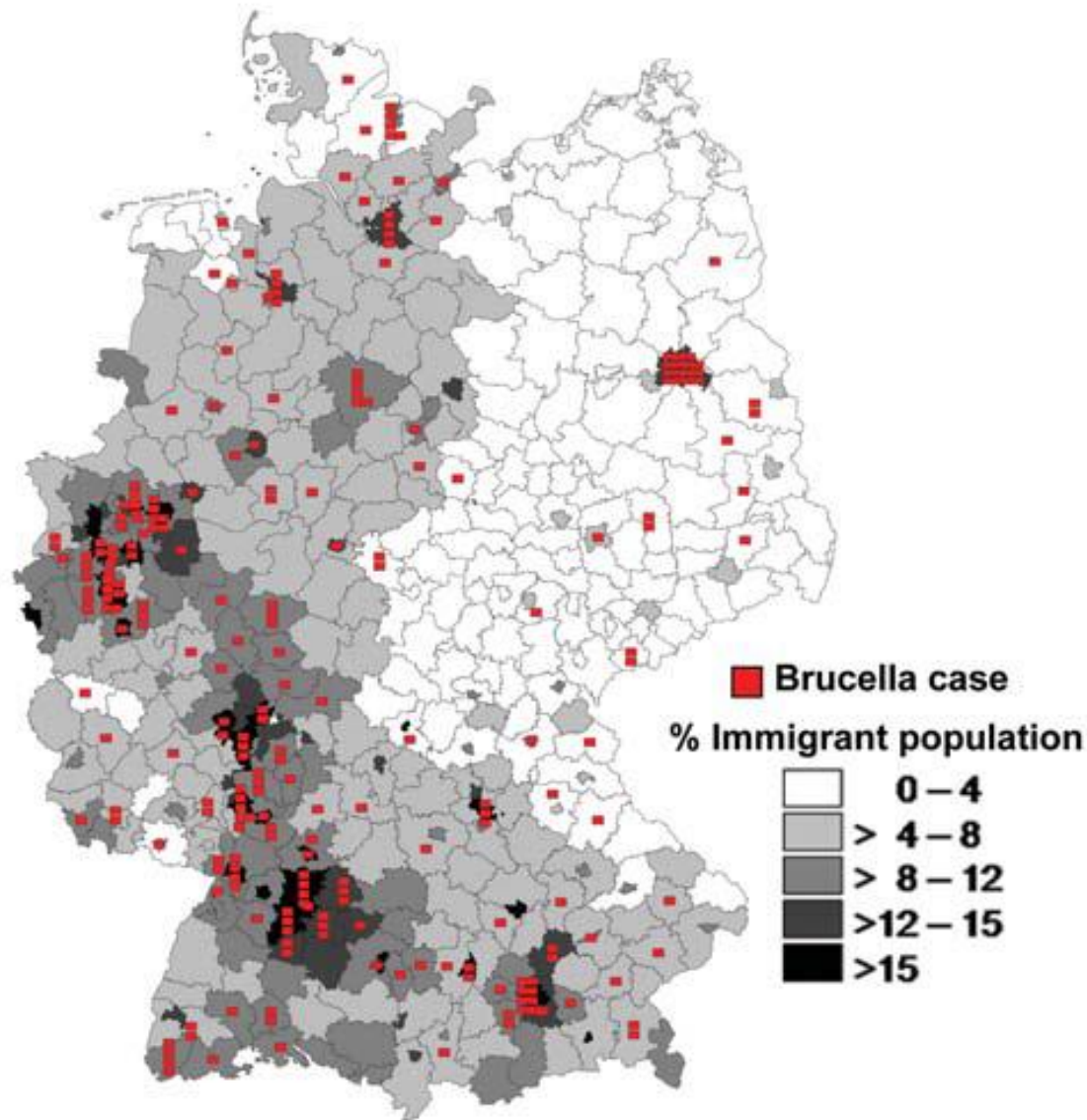
Changing Epidemiology of Human Brucellosis, Germany, 1962–2005

Sascha Al Dahouk,* Heinrich Neubauer,† Andreas Hensel,‡ Irene Schöneberg,§ Karsten Nöckler,‡
Katharina Alpers,§ Hiltrud Merzenich,¶ Klaus Stark,§ and Andreas Jansen§

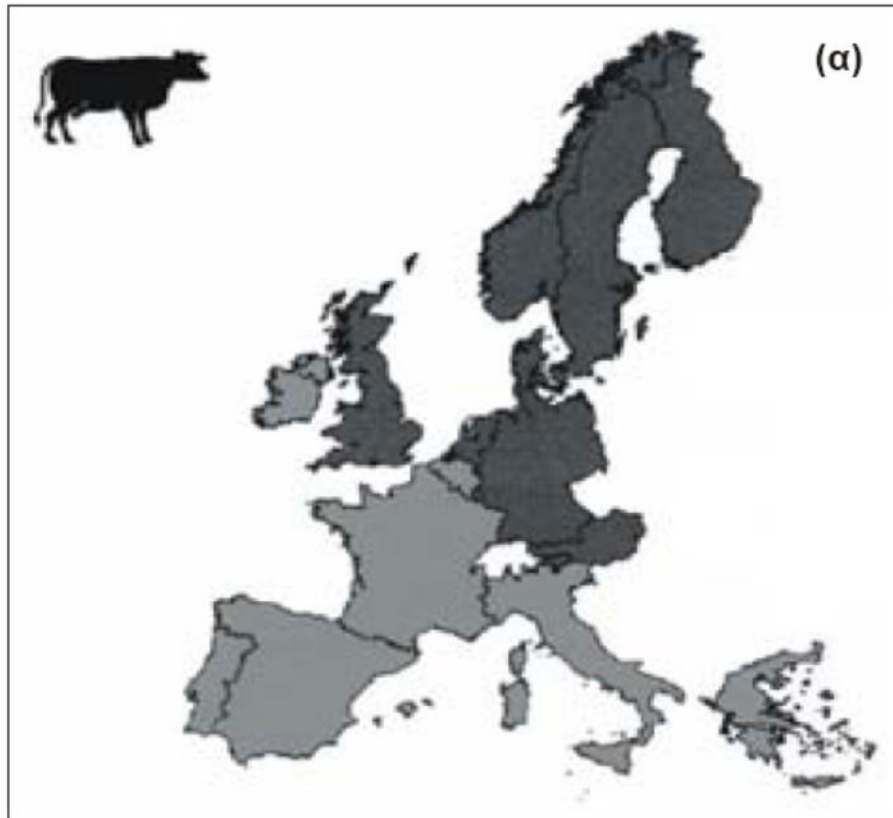
Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid • Vol. 13, No. 12, December 2007

The epidemiology of brucellosis in Germany has evolved from an endemic occupational disease among the German population into a travel-associated foodborne zoonosis, primarily affecting immigrants

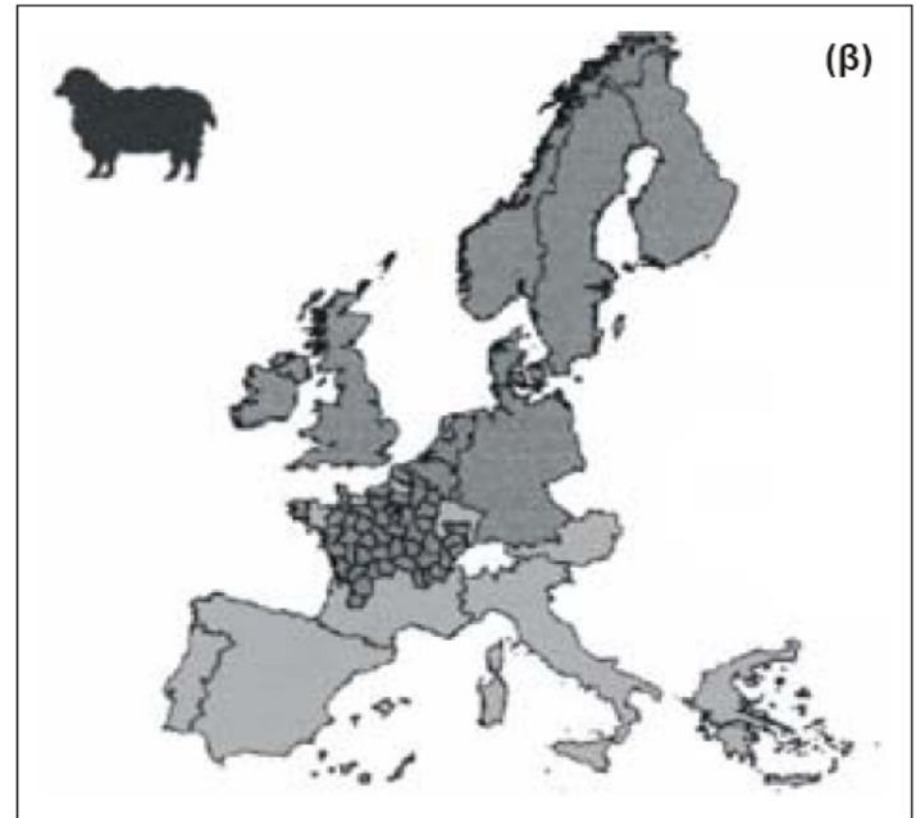
Regional distribution of brucellosis cases and percentage of immigrants per county, Germany, 1995–2005



Brucellosis and livestock in EU

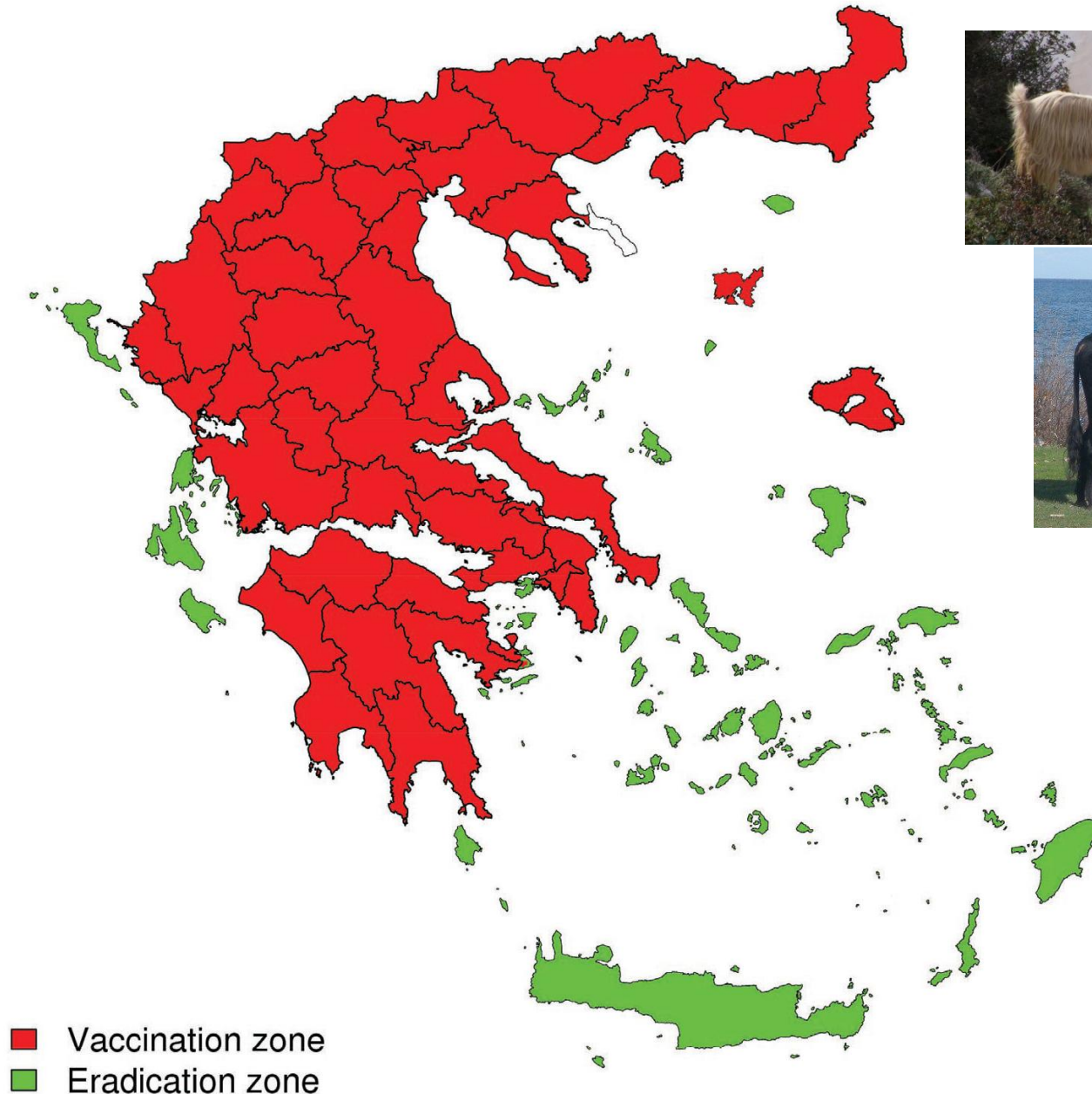


- *B. abortus* free countries
- *B. abortus* endemic countries



- *B. melitensis* free countries
- *B. melitensis* endemic countries

Zones of animal brucellosis control program in Greece



Βρουκέλλωση: παραδείγματα από την οικονομία

ΗΠΑ: τη δεκαετία του ενενήντα, δαπανήθηκαν περίπου 150 εκατομμύρια \$ ετησίως σε αντιβρουκελλικά προγράμματα

Λατινική Αμερική: οι ετήσιες οικονομικές απώλειες εξαιτίας της βρουκέλλωσης των ζώων υπολογίζονται σε 600.000.000 \$

Ελλάδα: το κόστος του αντιβρουκελλικού προγράμματος στα ζώα για έτος 1996 υπολογίστηκε, σύμφωνα με στοιχεία του Υπουργείου Γεωργίας, σε 3.300.000.000 δραχμές

The facts-3

- ✓ Human brucellosis causes **high clinical morbidity** and various clinical manifestations, mimicking many infectious and non-infectious diseases, as **any organ can be affected**
- ✓ **Up to 30% of patients develop chronic/latent disease**, which is characterized by atypical clinical picture, **high frequency of focal complications** (eg spondylitis), **chronic fatigue syndrome** and **relapses**

Τρόποι μετάδοσης στα ζώα

- κυρίως με επαφή ή με κάθετη μετάδοση (in utero)
- ερυθριτόλη
- τα μολυσμένα ζώα μεταδίδουν το μικρόβιο με τα ούρα, τα κόπρανα, το γάλα, τον πλακούντα (προϊόντα αποβολής ή τοκετού)
- ισόβια μόλυνση πολλές φορές (κατσίκες)

Τρόποι μετάδοσης στον άνθρωπο

- πεπτική οδός
- αναπνευστική οδός
- δέρμα
- επιπεφυκότες
- ενδοφλέβια οδός
- αυτοεμβολιασμός (*B. abortus* S19 ή *B. melitensis* REV-1)
- διαπλακούντια οδός (αυτόματες αποβολές 30%, συγγενής βρουκέλλωση, προωρότητα)
- θηλασμός
- σεξουαλική επαφή (ΟΧΙ)

Brucella melitensis, επιβίωση στα γαλακτοκομικά προϊόντα:

φρέσκο γάλα 25-37°C για 24 ώρες, στους 8°C για 48 ώρες,
στοις -40°C έως 2,5 έτη

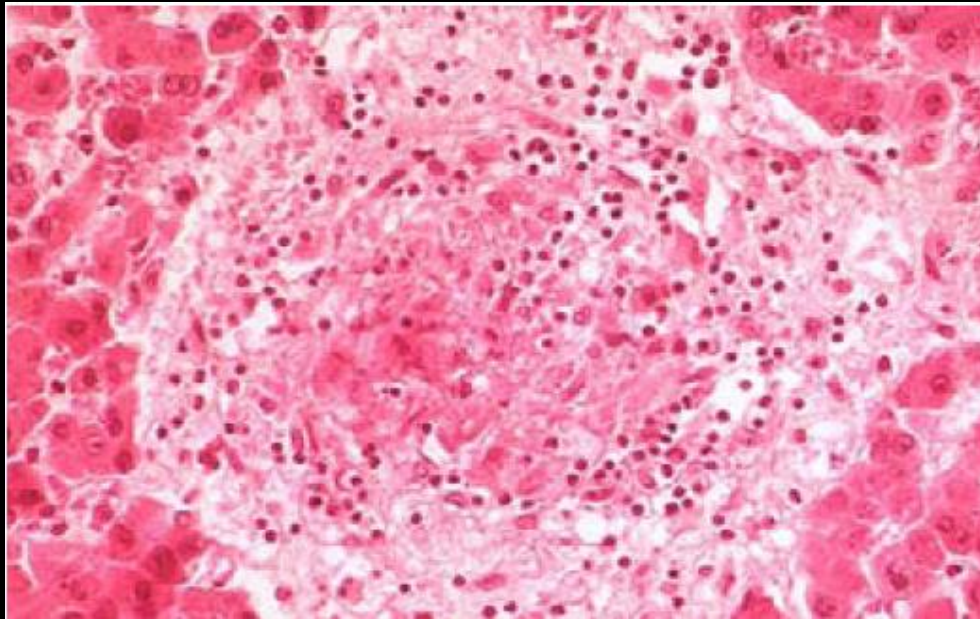
βούτυρο έως 11 ημέρες

φρέσκο τυρί που παρασκευάσθηκε από μη παστεριωμένο,
μολυσμένο γάλα αιγοπροβάτων, 2-3 μήνες

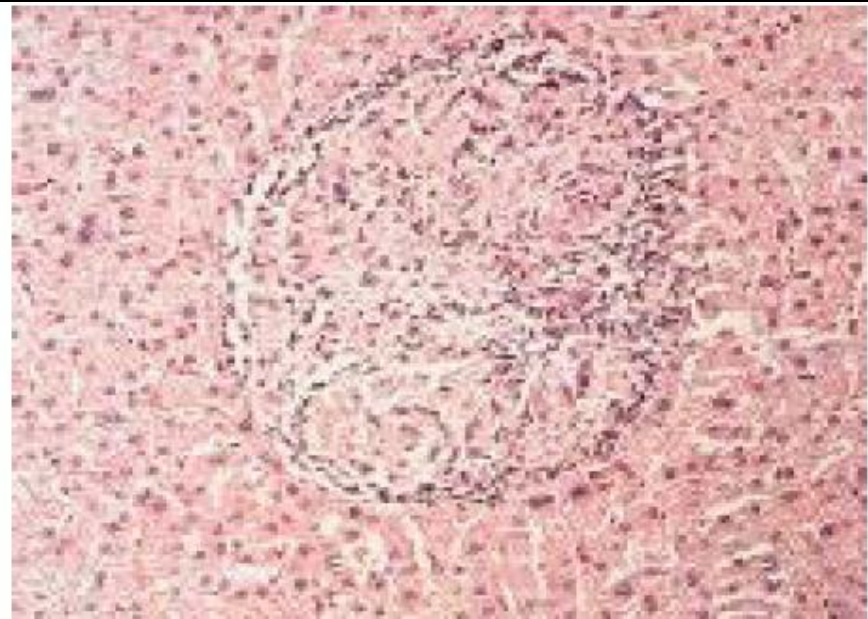
Βρουκέλλωση & βιοτρομοκρατία (Bioterrorism) CDC category B

- ✓ *Brucella suis* ήταν ο πρώτος παθογόνος μικροοργανισμός που αποθηκεύτηκε για πολεμική χρήση, κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1950 από το στρατό των ΗΠΑ
- ✓ μόλις 10-100 μικροοργανισμοί βρουκέλλας μολύνουν τον άνθρωπο μέσω **αερολύματος**
- ✓ η απελευθέρωση ικανής ποσότητας *Brucella melitensis* στην ατμόσφαιρα ενός πληθυσμού περίπου 500.000 ατόμων είναι δυνατόν να προκαλέσει 5.000 θανάτους και 125.000 σοβαρά ασθενείς
- ✓ το αντίστοιχο κόστος από τις απώλειες υπολογίζεται σε 477,7 εκατομμύρια \$ ανά 100.000 εκτιθέμενα άτομα

Ιστοπαθολογία



Κοκκίωμα πνεύμονα
Μυκοβακτηρίδιο φυματιώσεως

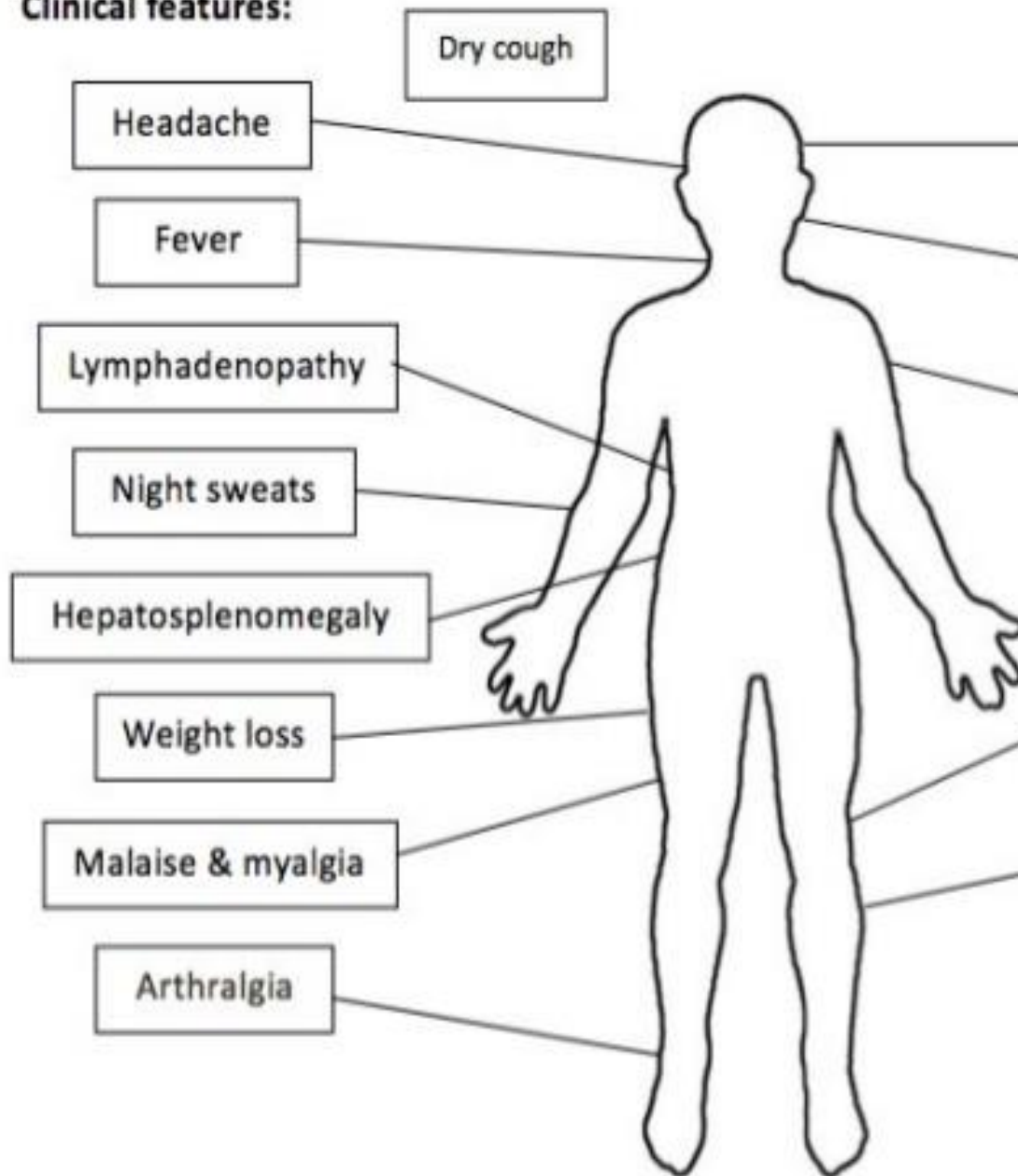


Κοκκίωμα ήπατος
Βρουκέλλα

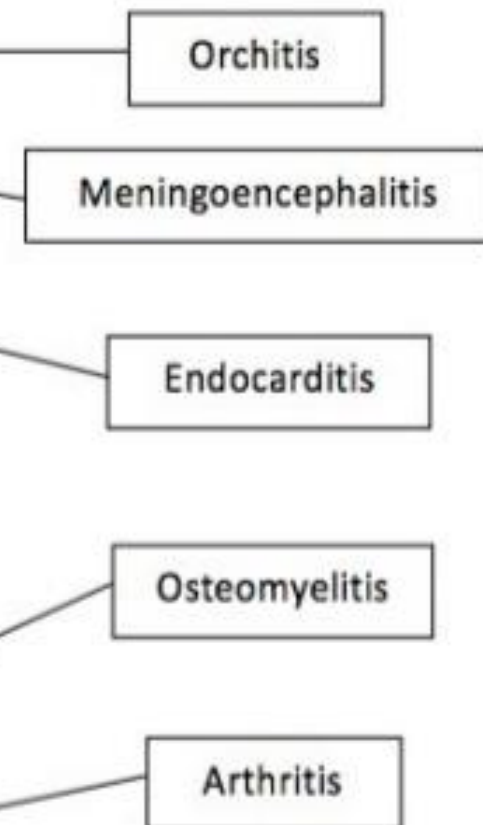
Κλινική εικόνα

- Χρόνος επώασης..... 9 ημέρες έως 2 μήνες
- Σημαντική ποικιλομορφία στις κλινικές εκδηλώσεις!!
- δύναται να προσβάλει ΟΠΟΙΟΔΗΠΟΤΕ ΟΡΓΑΝΟ
- 50% ύπουλη έναρξη, γενικά συμπτώματα ή ασυμπτωματική
- 50% αιφνίδια έναρξη, έντονα ή εστιακά συμπτώματα
- 25% χρονιότητα
- 10% υποτροπή

Clinical features:



Complications:

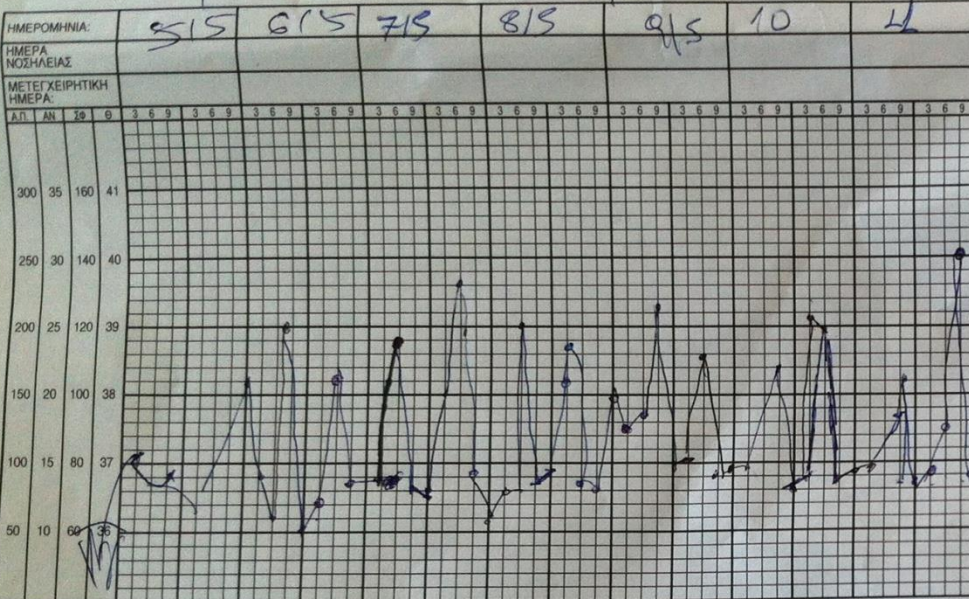


	<i>Ariza και συν 1995 (n=394)</i>	<i>Colmenero και συν 1996 (n=530)</i>	<i>Madkour και συν 2001 (n=500)*</i>	<i>Aygen και συν 2002 (n=480)</i>	<i>Memish και συν 2000 (n=160)**</i>	<i>Shaan και συν 2002 (n=115)***</i>
Συμπτώματα	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Πυρετός	355 (90)	530 (98)	464 (93)	383 (80)	146 (91)	101 (88)
Ρίγος	274 (70)	458 (86)	410 (82)		79 (49)	21 (18)
Εφίδρωση	353 (90)	450 (85)	437 (87)	405 (84)	30 (19)	10 (9)
Αδυναμία/Αδιαθεσία	265 (67)	387 (73)	473 (95)	432 (90)		21 (18)
Αρθραλγίες		260 (50)		393 (82)	105 (66)	84 (73)
Μυαλγίες		203 (39)		236 (49)		
Αρθραλγίες/Μυαλγίες	217 (55)					
Οσφυαλγία		125 (24)		281 (59)		
Άλγη			457 (91)			
Αρθραλγίες/Οσφυαλγία			431 (86)			
Κεφαλαλγία			403 (81)	91 (19)	26 (16)	8 (7)
Ανορεξία			388 (78)	198 (41)		
Απώλεια βάρους			326 (65)	213 (44)		
Δυσκοιλιότητα			234 (47)			
Κοιλιακό άλγος			225 (45)	101 (21)		2 (2)
Διάρροια	40 (10)		34 (7)			2 (2)
Ναυτία				155 (32)		
Έμετος				104 (22)		
Διαταραχές ύπνου			185 (37)		* συμπεριλαμβάνονται 56 παιδιά	
Βήχας	123 (31)		122 (24)		** μελέτη σε βακτηριαμικούς ασ	
Επίσταξη		12 (2)			*** μελέτη σε παιδιά	

ΘΕΡΜΟΜΕΤΡΙΚΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΣΘΕΝΟΥΣ

Επώνυμο: [REDACTED] Πατρώνυμο: [REDACTED]



ΤΡΙΩΡΕΣ ΘΕΡΜΟΜΕΤΡΗΣΕΙΣ

ΗΜ/ ΝΙΑ:						
ΩΡΑ:						
06:00						
09:00						
12:00						
15:00						
18:00						
21:00						
00:00						
03:00						
ΒΑΡΟΣ ΣΩΜΑΤΟΣ:		65 kg		63 kg		
ΚΕΝΟΣΕΙΣ:						

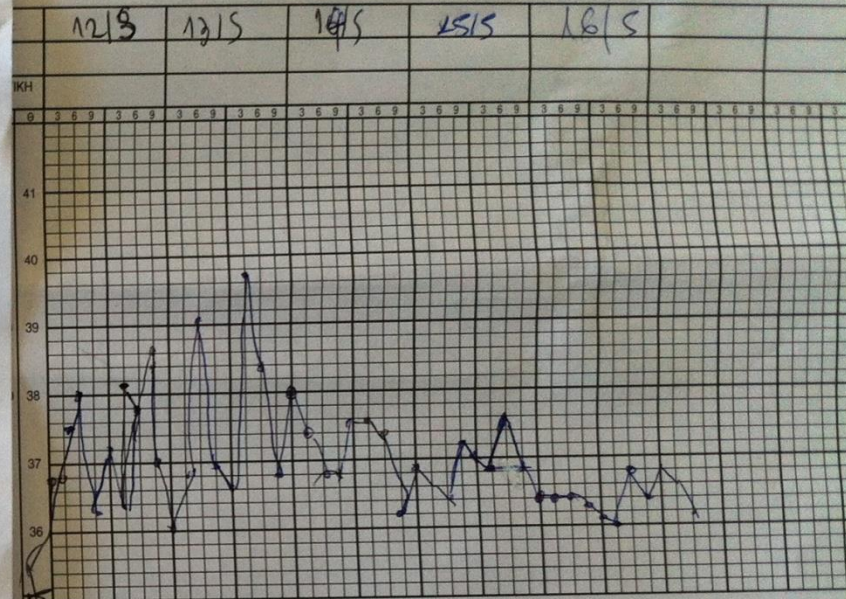
ΟΥΡΑ: 600cc 700cc 800 2000 2500 2.500

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΣ: ΔΡΑΓΑΝΑ 68 100 ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΥΠΟΛΗ, Τηλ. 25510 - 74000 Fax: 25510 - 76191

ΘΕΡΜΟΜΕΤΡΙΚΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΣΘΕΝΟΥΣ

Επώνυμο: [REDACTED] Πατρώνυμο: [REDACTED]



ΤΡΙΩΡΕΣ ΘΕΡΜΟΜΕΤΡΗΣΕΙΣ

ΗΜ/ ΝΙΑ:						
ΩΡΑ:						
06:00						
09:00						
12:00						
15:00						
18:00						
21:00						
00:00						
03:00						
ΒΑΡΟΣ ΣΩΜΑΤΟΣ:		64 kg	64 kg	63 kg		
ΚΕΝΟΣΕΙΣ:						

ΟΥΡΑ: 3600cc 2400 2800 2400 2400

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΣ: ΔΡΑΓΑΝΑ 68 100 ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΥΠΟΛΗ, Τηλ. 25510 - 74000 Fax: 25510

Ευρήματα	<i>Ariza και συν 1995 (n=394)</i>	<i>Colmenero και συν 1996 (n=530)</i>	<i>Madkour και συν 2001 (n=500)*</i>	<i>Aygen και συν 2002 (n=480)</i>	<i>Memish και συν 2000 (n=160)**</i>	<i>Shaaan και συν 2002 (n=115)***</i>
Ηπατομεγαλία	215 (55)	202 (38)	97 (19)	102 (21)	9 (6)	15 (13)
Σπληνομεγαλία	179 (45)	118 (22)	125 (25)	68 (14)	11 (7)	14 (12)
Λεμφαδενοπάθεια	81 (21)	48 (9)	160 (32)			2 (2)
Αρθρίτιδα		127 (23)	202 (40)	91 (19)	68 (43)	82 (71)
Ευαισθησία στην οσφύ			241 (48)			
Ορχεοεπιδιδυμίτιδα		24 (5)	62 (21)	5 (1)	3 (2)	
Νευρικό σύστημα		48 (9)	20 (4)	31 (7)	8 (5)	3 (3)
Δέρμα	24 (6)	18 (3)	72 (14)	2 (0,5)		2 (2)
Ενδοκαρδίτιδα			17 (3)	2 (0,5)	3 (2)	
Σχετική βραδυκαρδία		112 (21)				
Αναπνευστικό σύστημα			7 (1)	1 (0,5)		1 (1)
Ήκτερος			6 (1)			
Περιτονίτιδα				2 (0,5)		
Αποβολή					8 (5)	
Όψη πάσχοντος			127 (25)			
Εστιακή νόσος/Επιπλοκή	86 (22)				90 (56)	

* συμπεριλαμβάνονται 56 παιδιά, ** μελέτη σε βακτηριαιμικούς ασθενείς, *** μελέτη σε

Μορφές νόσου

- Οξεία νόσος
- Χρόνια νόσος (έως 25%) (υποτροπιάζουσα, άτυπη)
- Ενεργός νόσος
- Εστιακή νόσος (καθυστερημένη διάγνωση)



- φυματίωση
- τυφοειδής πυρετός
- λεισμανίαση
- νοσήματα συνδετικού ιστού
- σαρκοείδωση
- λεμφώματα

Εστιακές εντοπίσεις (επιπλοκές)-1

Μυοσκελετικό

- περιφερική αρθρίτιδα (34%-54%)
- ιερολαγονίτιδα (2%-55%)
- σπονδυλίτιδα (20-65%).....ΟΜΣΣ

Ουροποιογεννητικό

- ετερόπλευρη ορχεοεπιδιδυμίτιδα (2-20%)
- προστατίτιδα
- πυελονεφρίτιδα, σπειραματονεφρίτιδα (σπάνιο)
- πρόωρες κυήσεις
- αυτόματες αποβολές και ενδομήτριους θανάτους, 1^ο/2^ο τρίμηνο (17-46%) ??

Εστιακές εντοπίσεις (επιπλοκές)-2

ΓΕΣ (12%)

- ηπατοσπληνομεγαλία
- κοκκιωματώδης ηπατίτιδα, απόστημα
- χολοκυστίτιδα, περιτονίτιδα, παγκρεατίτιδα (σπάνια)

Νευρικό

- ΚΝΣ (5-7%)
- ψυχιατρικές εκδηλώσεις.....(χρόνια νόσο)

Καρδία (2%) - Αγγεία

- ενδοκαρδίτιδα (κυρίως αορτική).....**βαριά επιπλοκή**
- μυοκαρδίτιδα, περικαρδίτιδα, θρομβοφλεβίτιδα (σπάνια)

Εστιακές εντοπίσεις (επιπλοκές)-3

Αναπνευστικό (1-5%)

- όλο το φάσμα
- ΌΧΙ απομόνωση από τα πτύελα

Αίμα

- συχνές, αλλά μη ειδικές
- λεμφοκυττάρωση, αναιμία, θρομβοπενία, παγκυτταροπενία

Δέρμα (5%)

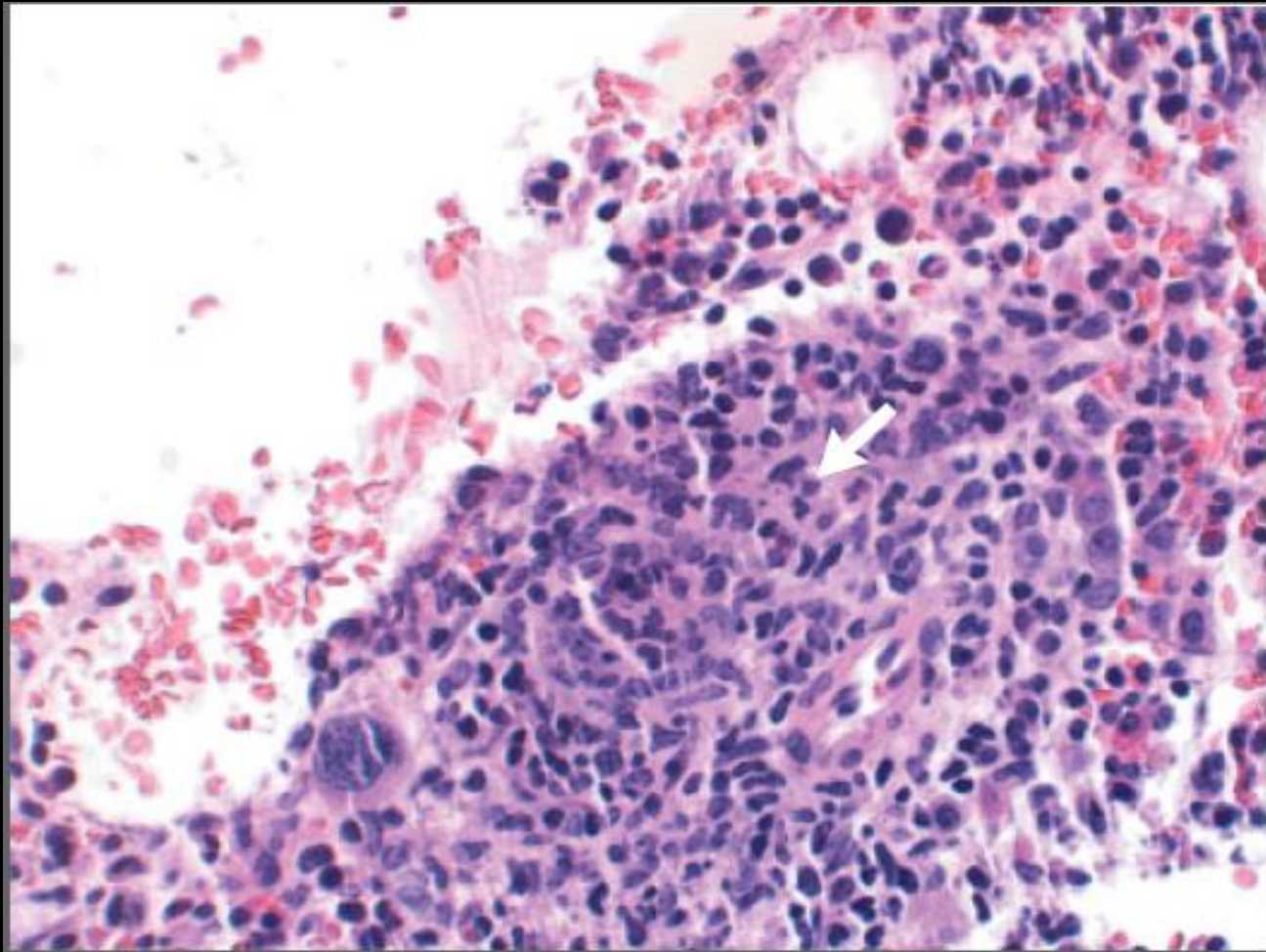
- πληθώρα μη ειδικών εκδηλώσεων

Βρουκέλλωση: τα κοινότερα εργαστηριακά ευρήματα

	Total number of patients	Anaemia	Leucopenia	Leucocytosis	Thrombocytopenia	Thrombocytosis	Elevated CRP	Elevated ESR	Positive RF
Kokoglu et al (2006) ⁹	138	46 (33.3%)	30 (21.7%)	10 (7.2%)	27 (19.6%)	..	72 (52.2%)	58 (42.0%)	37 (26.8%)
Hasanjani Roushan et al (2004) ⁷	469	71 (15.1%)	14 (3.0%)	57 (12.2%)	16 (3.4%)	5 (1.1%)	277 (59.1%)	365 (77.8%)	40 (8.5%)
Barroso Garcia et al (2002) ³⁰	565	171 (30.3%)	61 (10.8%)	34 (6.0%)	..	..	..	390 (69.0%)	..
Troy et al (2005) ³⁶	28	21 (75%)	23 (82%)	..	5 (18%)	..	..	..	..
Tsolia et al (2002) ^{39*}	39	18 (46%)	..	1 (3%)	3 (8%)	..	..	..	..

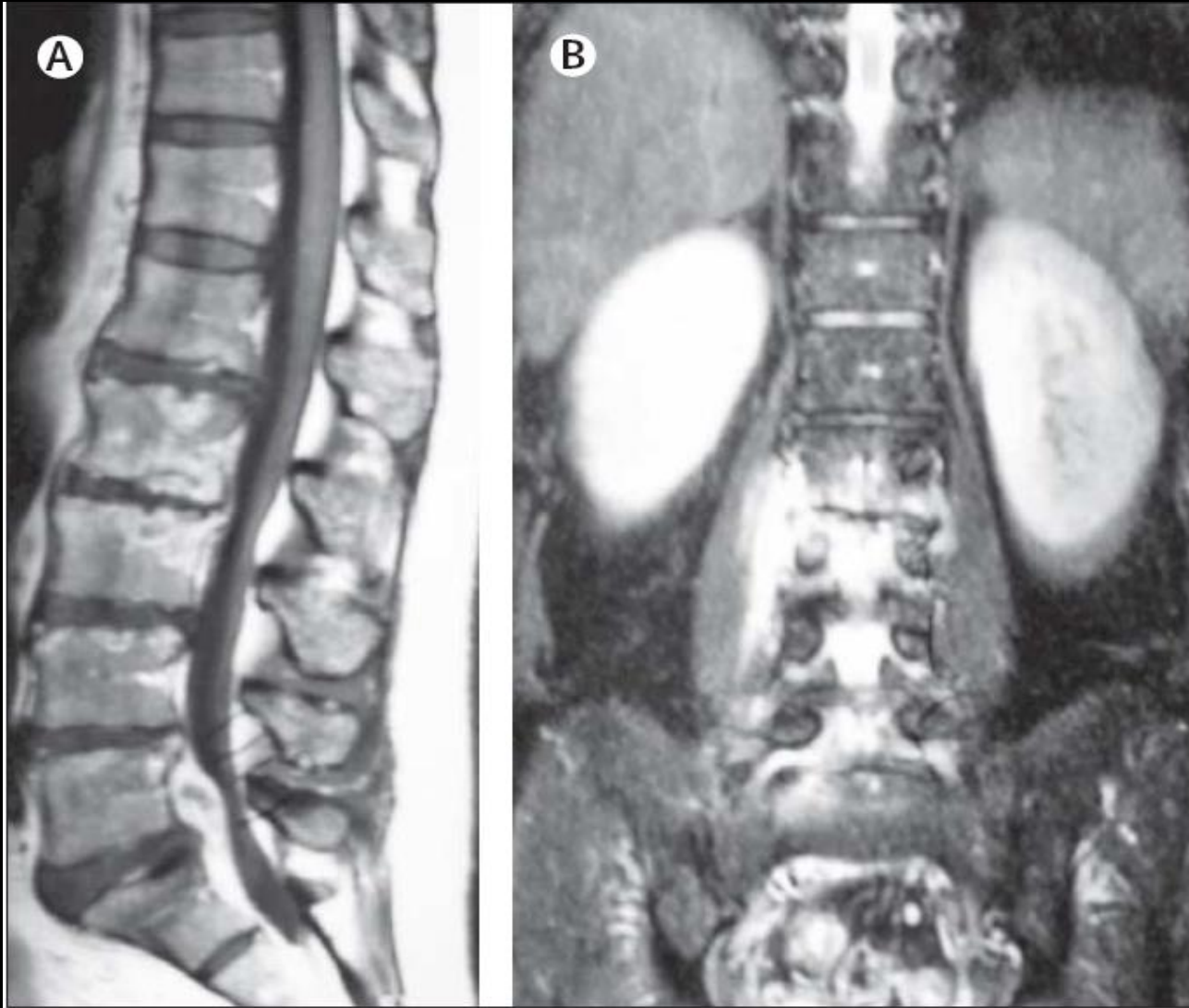
Data shown as number of patients with laboratory finding (%). ..=not reported. CRP=C-reactive protein. ESR=erythrocyte sedimentation rate. RF=rheumatoid factor. *Studies in paediatric population only.

Table 2: Most common laboratory findings in patients with brucellosis



Κοκκίωμα μυελού οστών
Brucella

Βρουκέλλωση



Σπονδυλοδισκίτιδα, ιερολαγονίτιδα, απόστημα ψοίτη



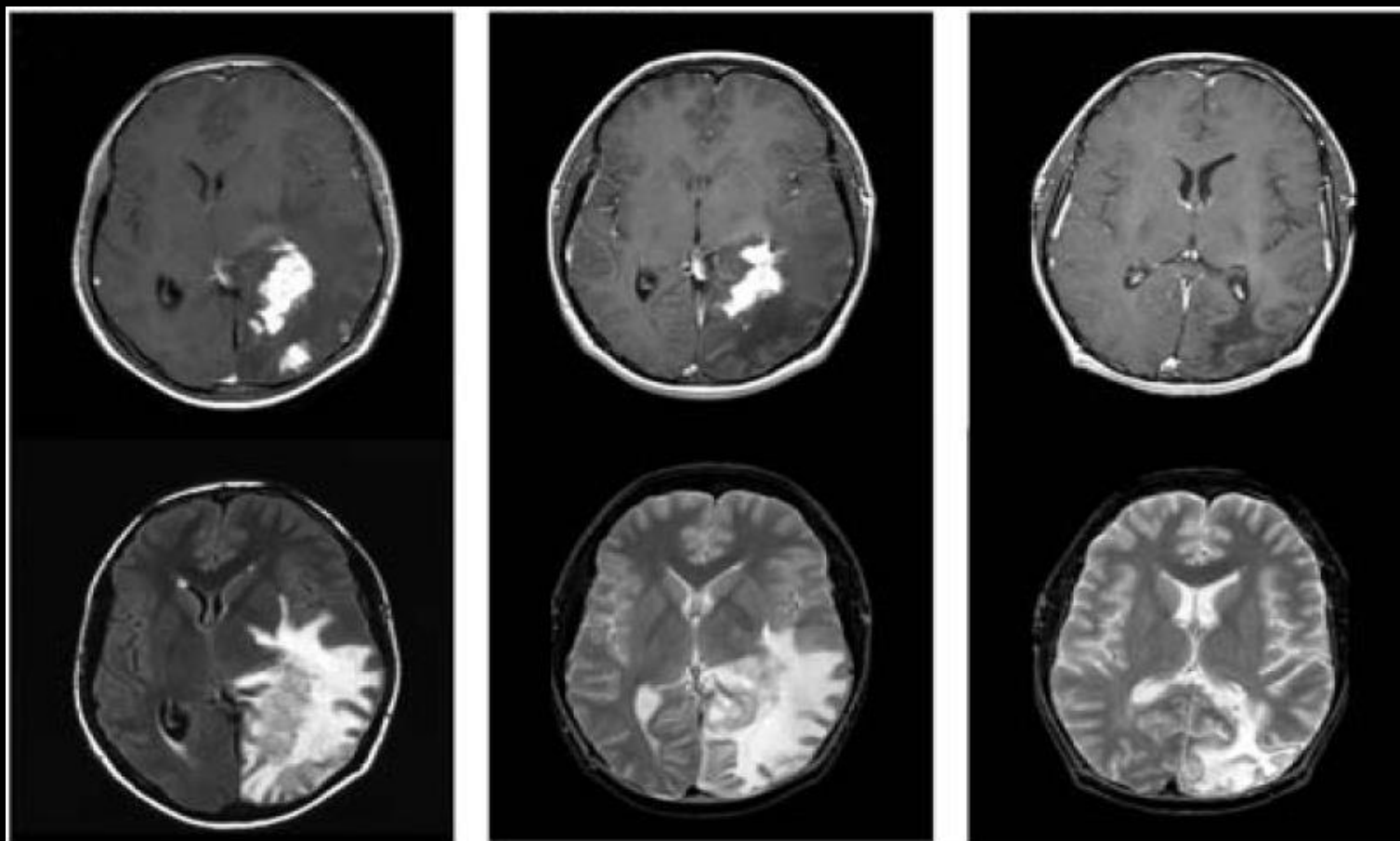


Νεκρωτική ορχίτιδα

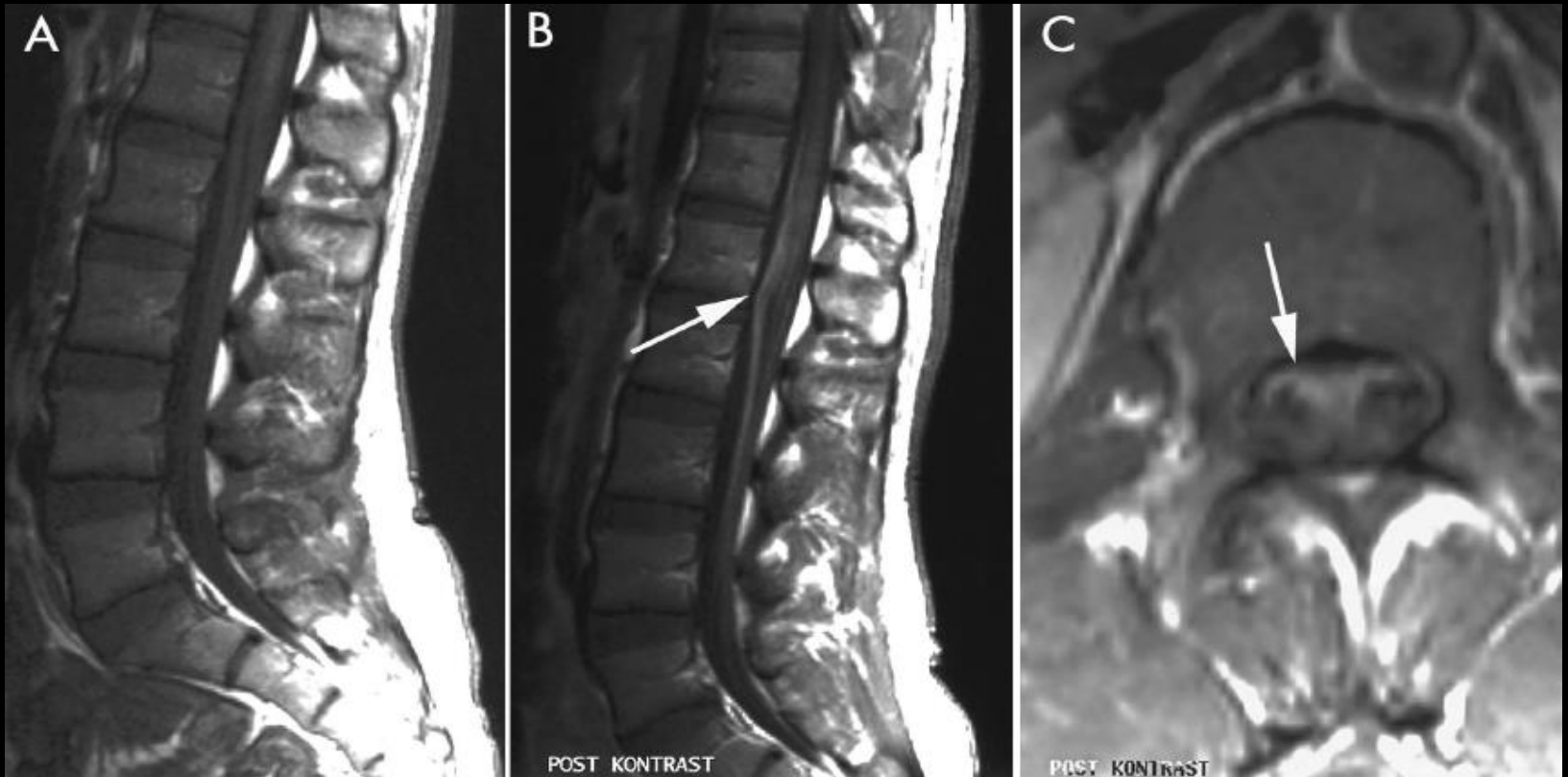
Ηπατικό απόστημα U/S, MRI



Ηπατοσπληνικά κοκκιώματα, CT



Προσβολή εγκεφάλου
(νευροβρουκέλλωση)



Προσβολή νωτιαίου μυελού
(νευροβρουκέλλωση)

Διάγνωση

- Καλλιέργεια (αίμα, μυελός, άλλοι ιστοί)
 - Ορολογικά (συγκολλητινοαντιδράσεις)
 - Wrihgt, Rose Bengal (οξεία νόσος)
 - Έμμεση Coombs (χρόνια νόσος, υποτροπή)
 - Σύνδεση συμπληρώματος
 - ELISA (IgG, IgM, IgA)
 - PCR, Real-Time PCR
 - Άλλοι βιοδείκτες (biomarkers)
- (ταξινόμηση, διάγνωση, λήψη θεραπευτικής απόφασης)

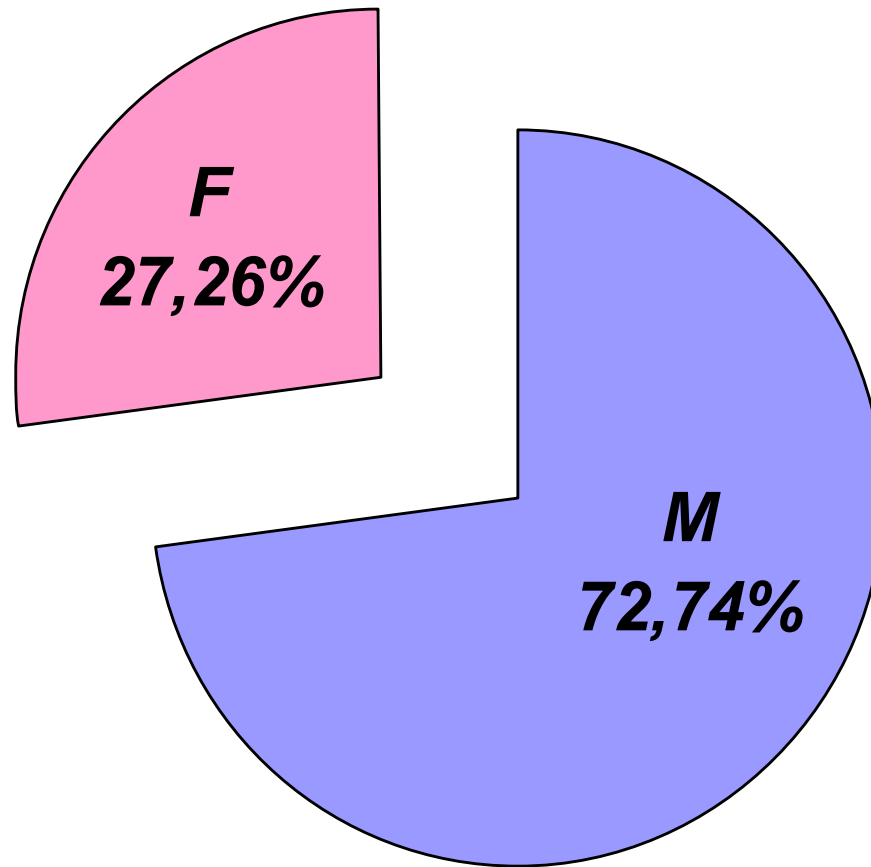
3rd Balkan Congress of Immunology, Athens, 2001

**Clinical Immunology Laboratory, 2nd Department of Internal Medicine,
Aristotle University of Thessaloniki, Hippokration Hospital,
Thessaloniki, Greece.**

**Department of Internal Medicine, Hospital for Infectious Diseases,
Thessaloniki, Greece.**

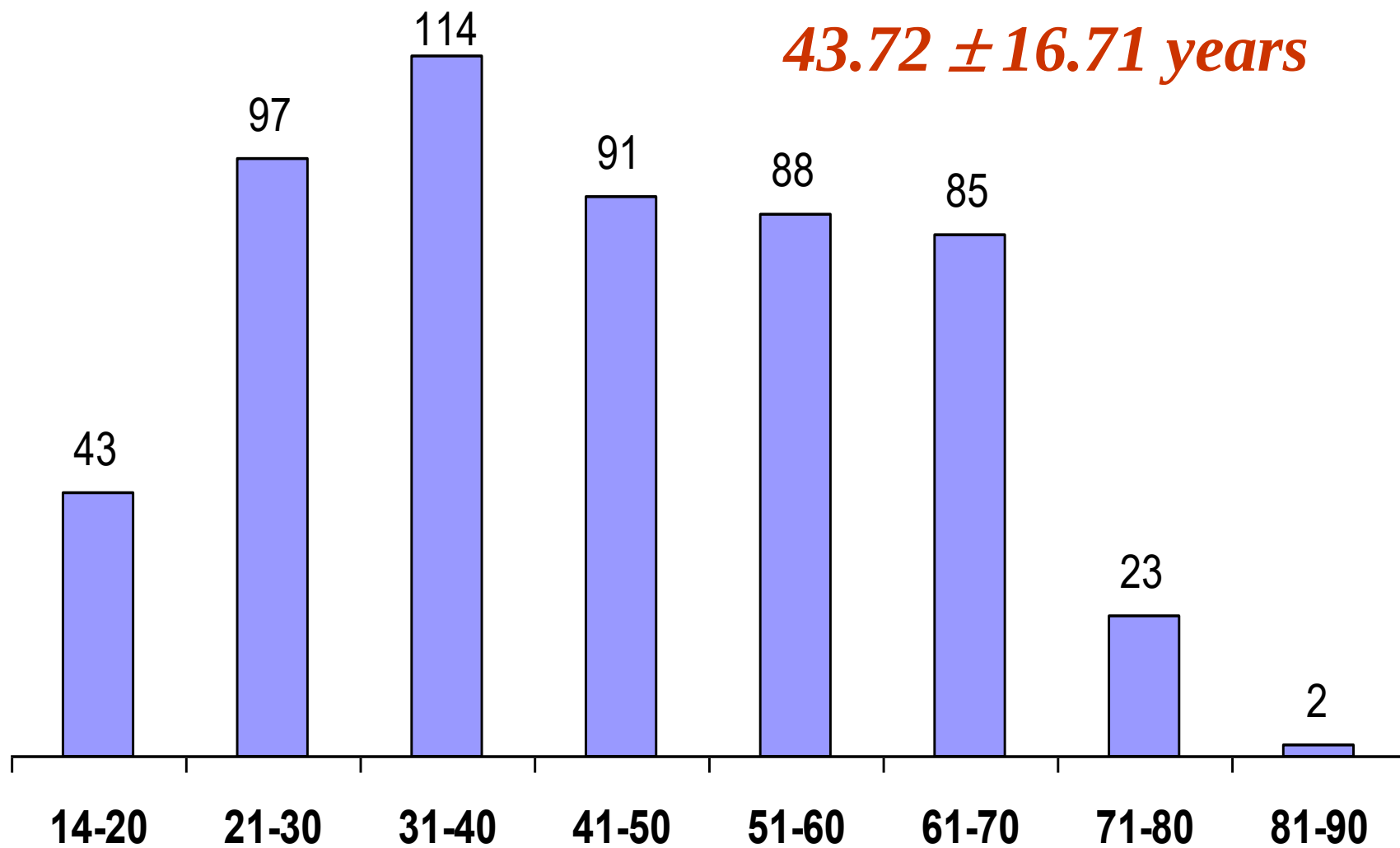
Skendros et al 2001

543 brucellosis patients (1997-2000)

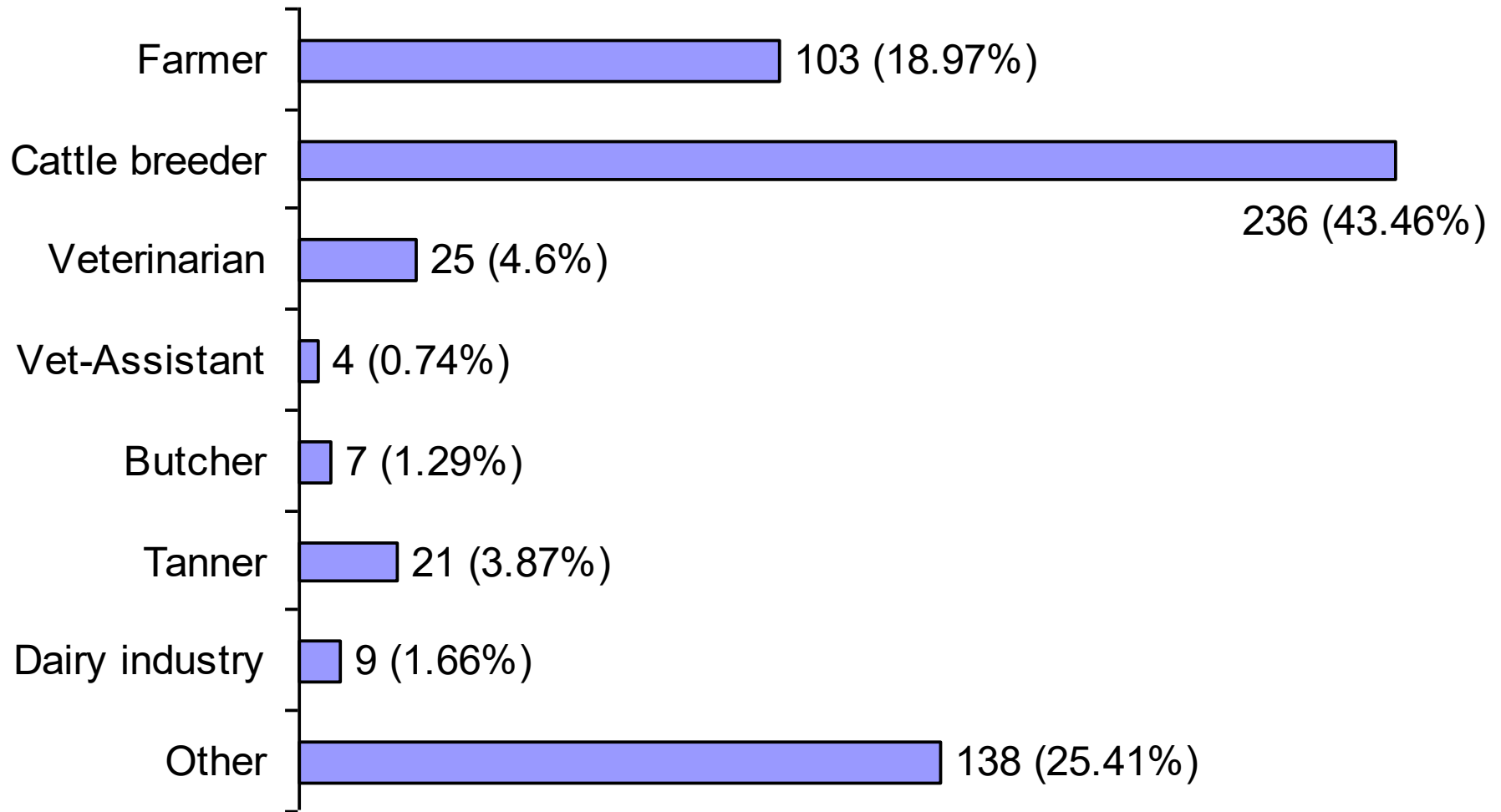


mean age

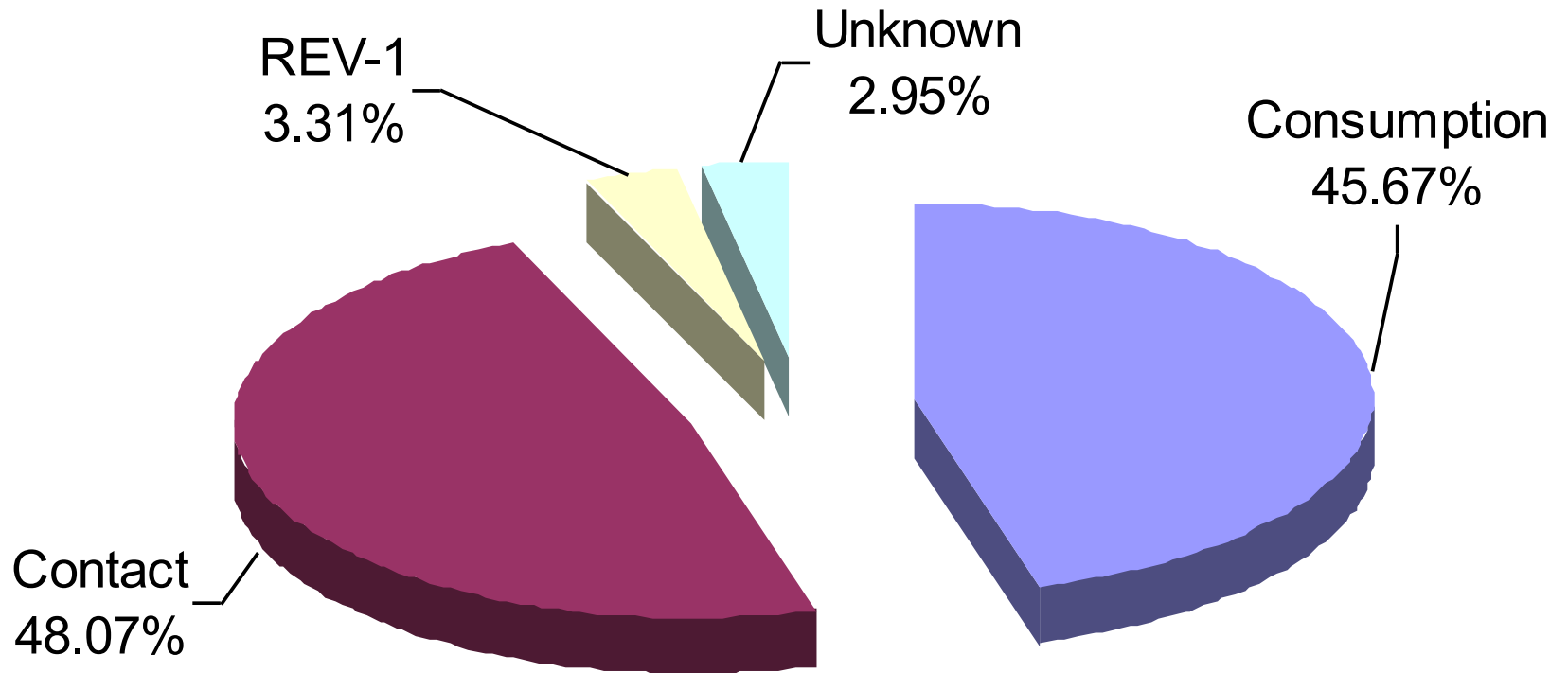
43.72 ± 16.71 years



Patients and occupation



Patients and modes of transmission

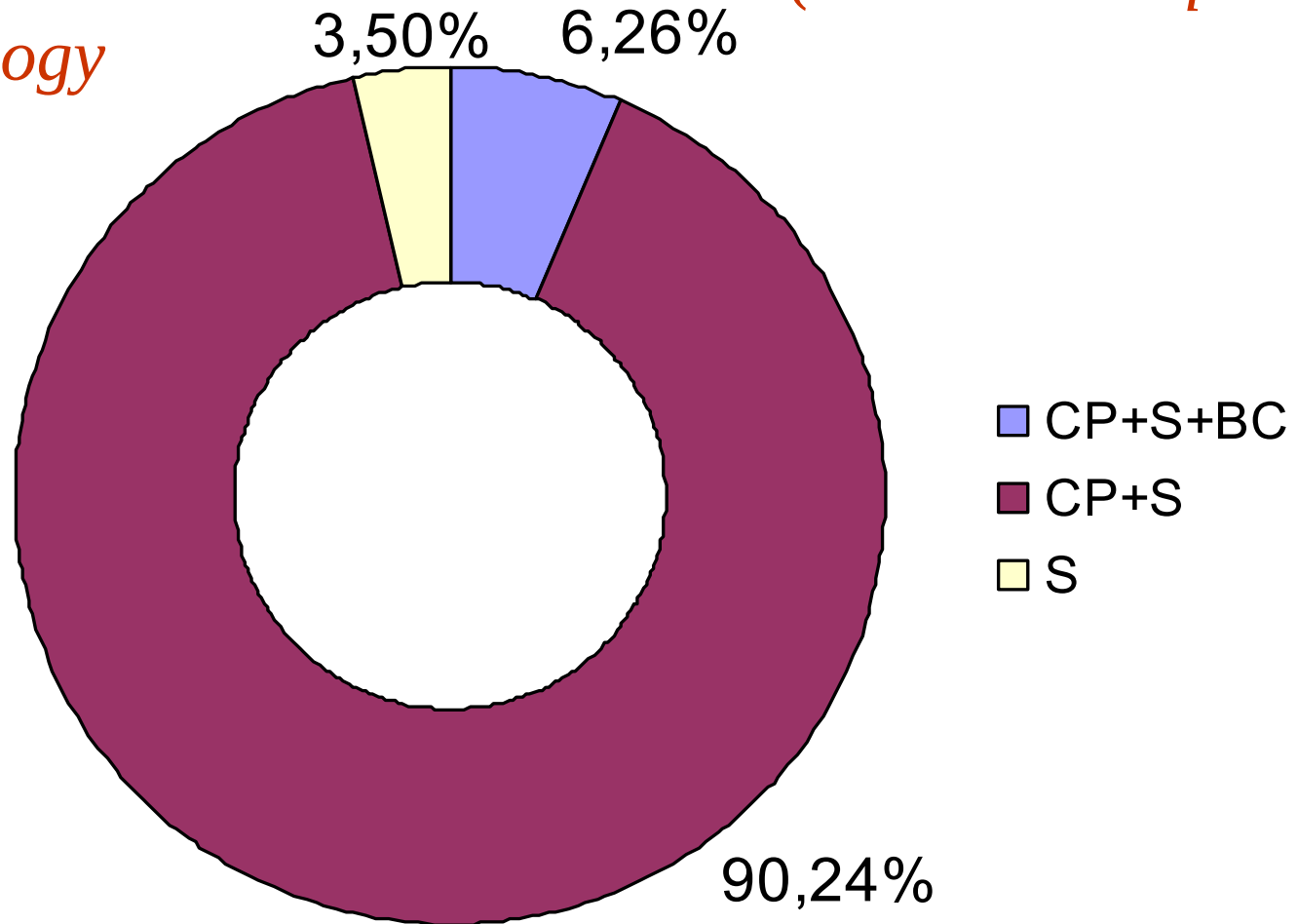


Diagnosis of brucellosis

CP: clinical picture

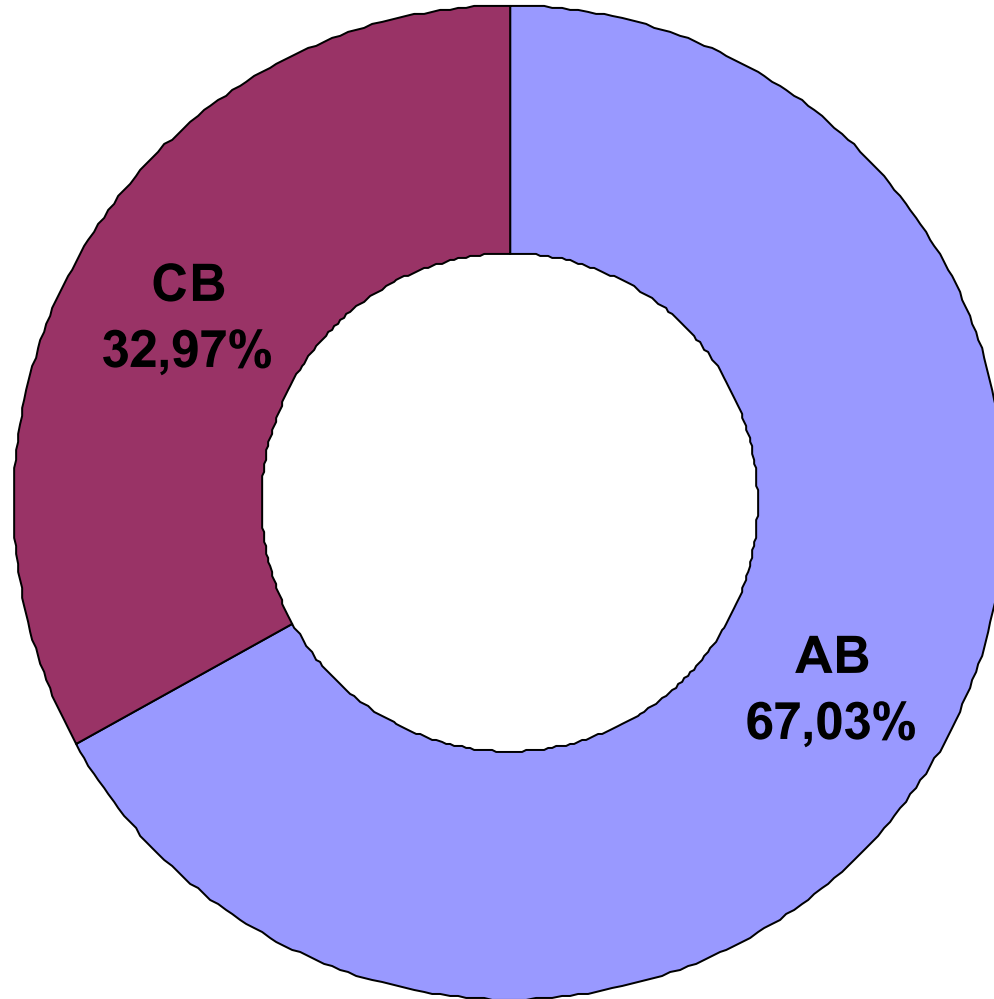
BC: blood culture
(whenever requested)

S: serology

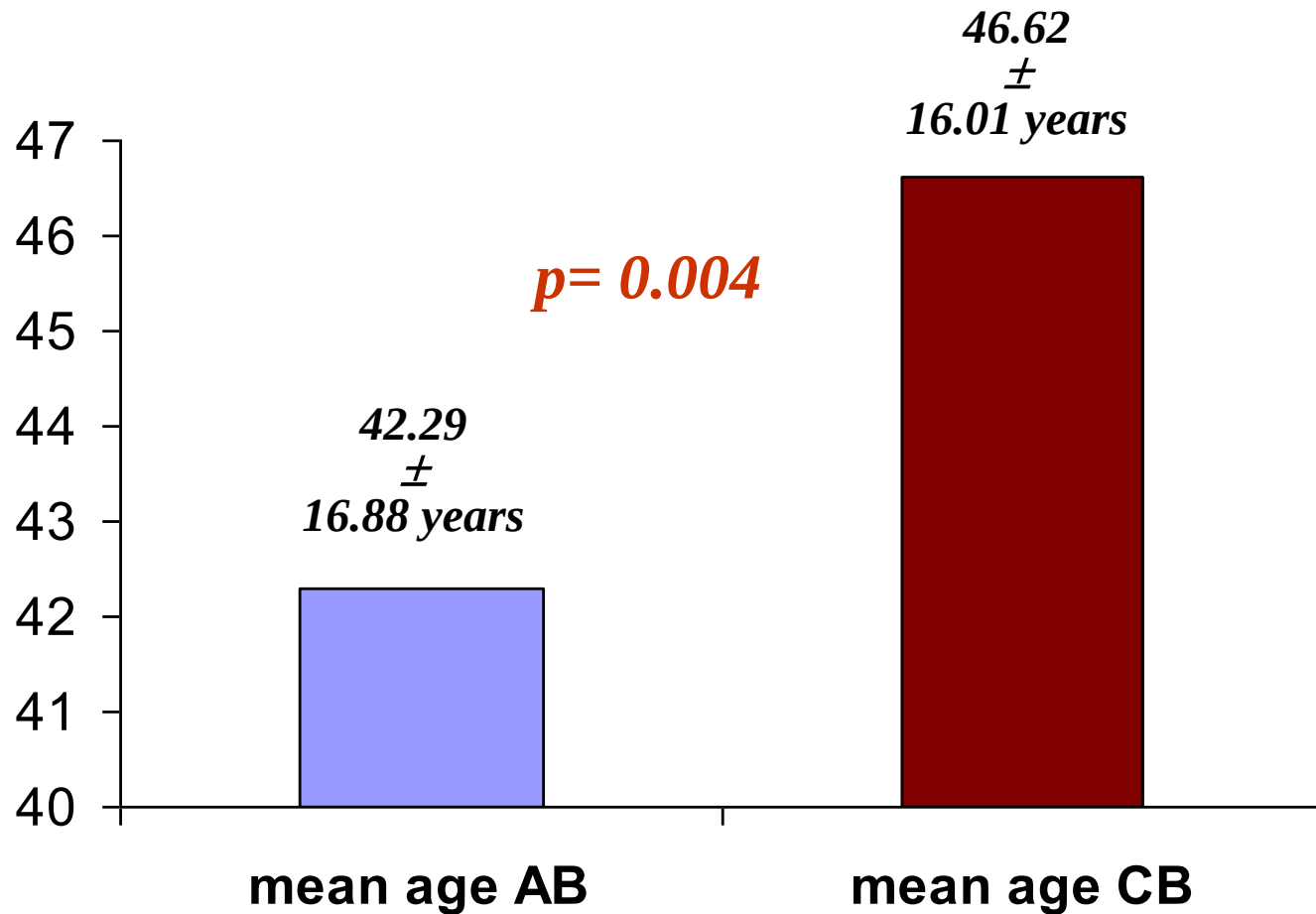


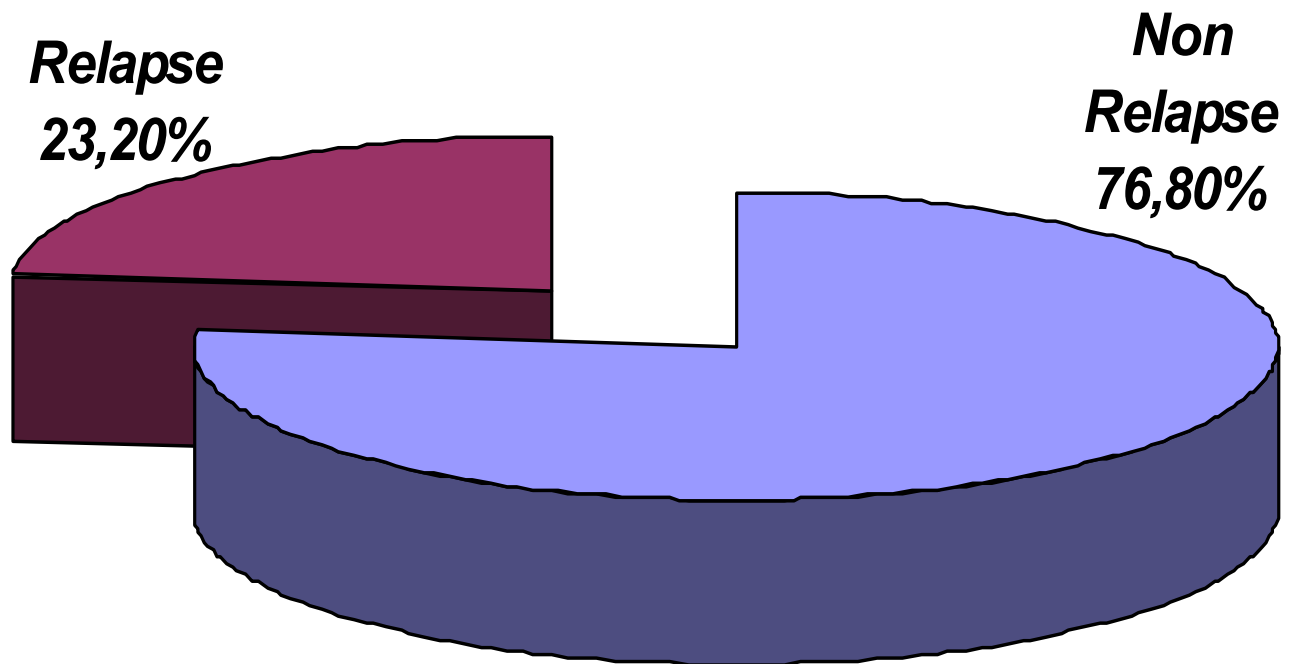
Patients and disease classification

acute vs chronic

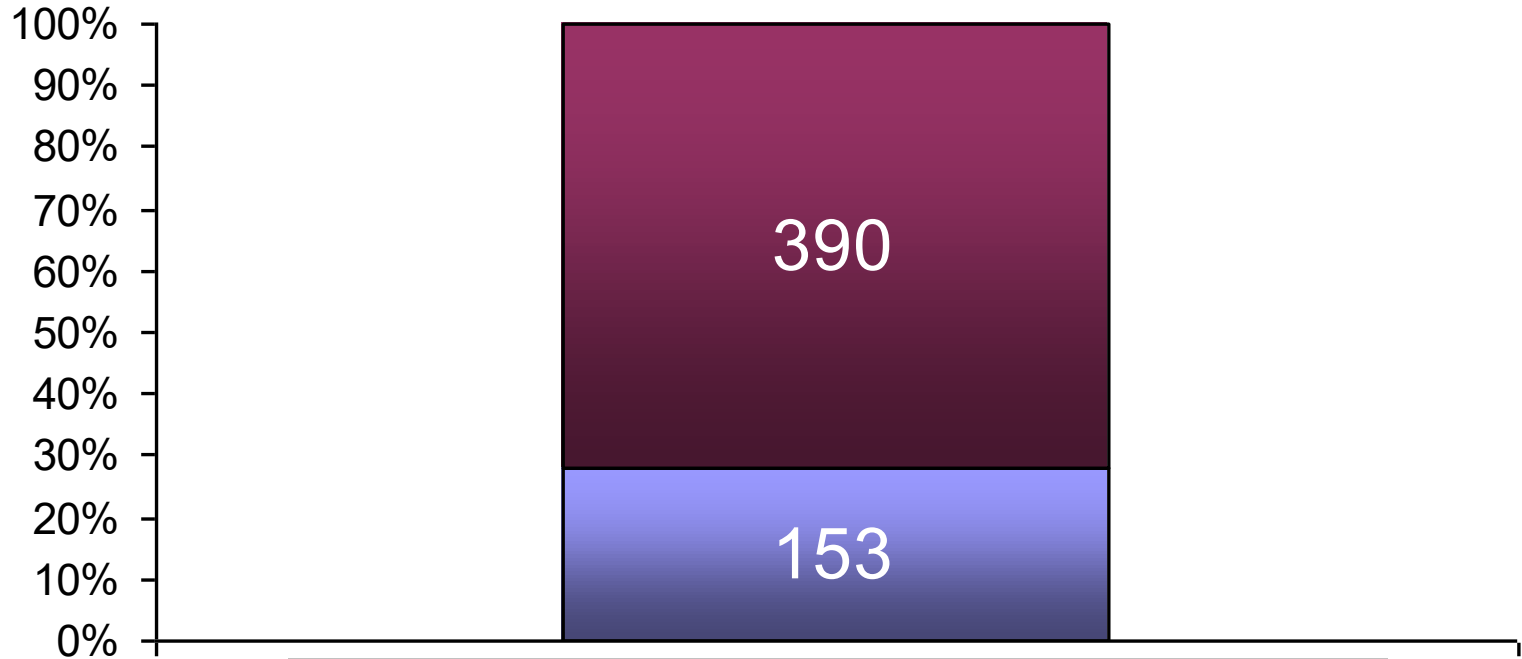


Disease classification and age





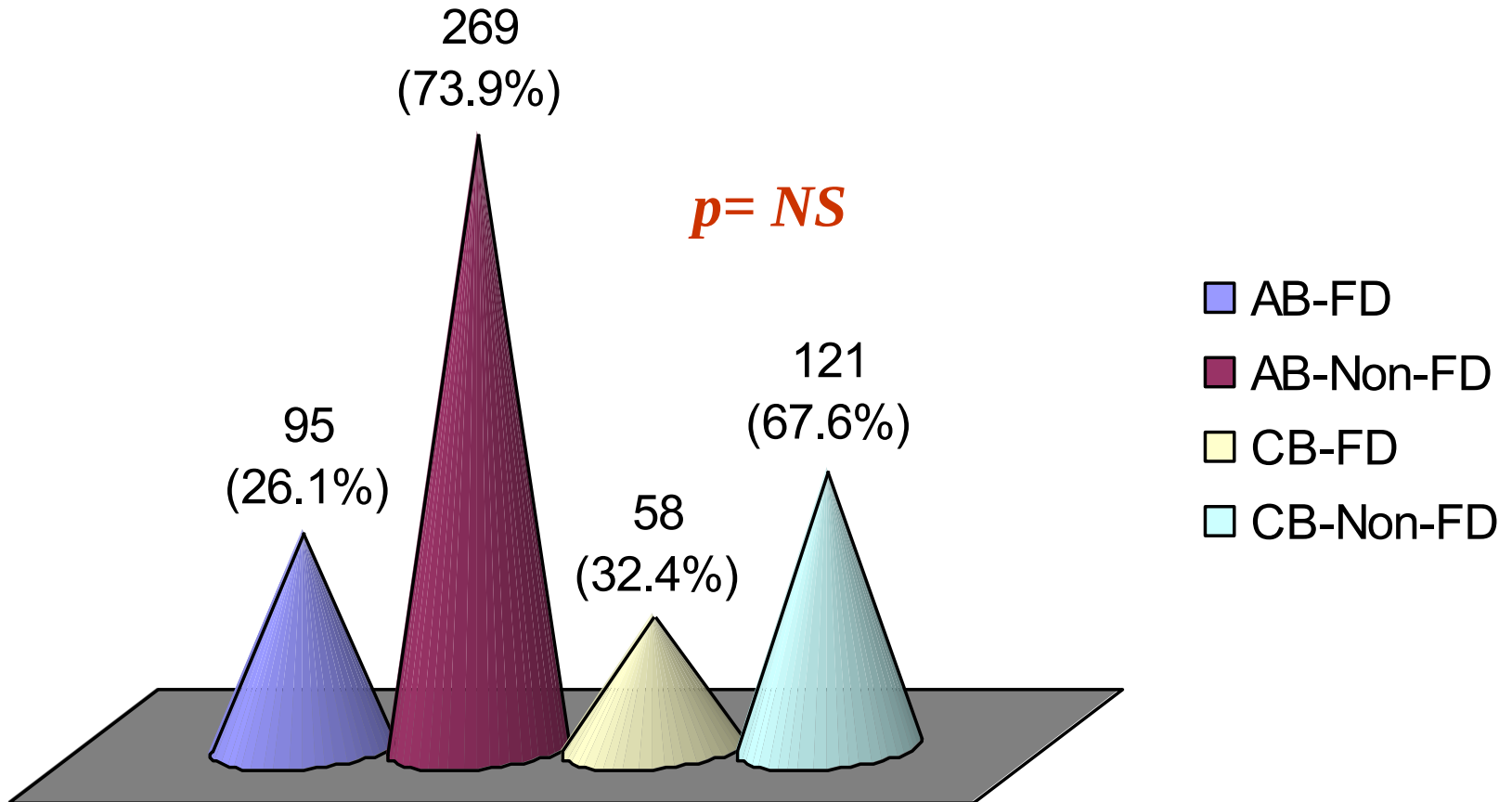
***Brucellosis
and
relapse***



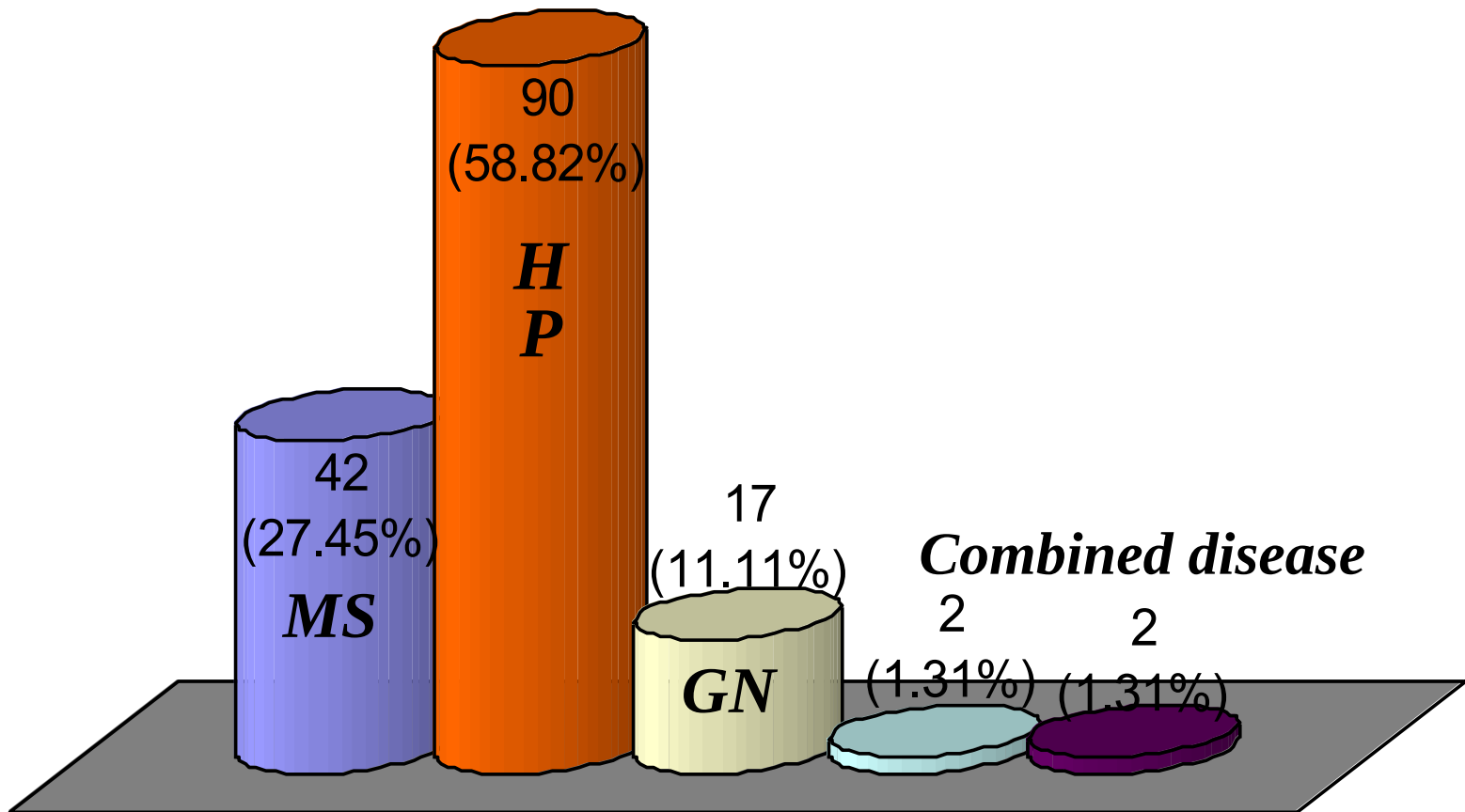
Brucellosis and focal disease (FD)

■ FD ■ Non-FD

Disease classification and focal disease



Classification of focal disease



Ορολογική δοκιμασία	Βρουκέλλωση		
	οξεία	χρόνια	υποτροπή
Wright	++	–	±
Rose Bengal	+++	–	±
Έμμεση Coombs	±	+++	+++
Σύνδεση συμπληρώματος	+	+++	++
IgM ELISA	+++	–	–
IgG ELISA	++	+++	+++
IgA ELISA	+	+++	+++

QUIZ ΗΜΕΡΑΣ:

Κτηνοτρόφος, 66 ετών, πυρετός από 15 ημέρου (πρωί-βράδυ), κακουχία, σπληνομεγαλία, λευκοπενία, αναιμία, ΤΚΕ= 80, Wright: 1/160

- Σίγουρα βρουκέλλωση
- Μάλλον βρουκέλλωση
- Μάλλον όχι βρουκέλλωση
- Σίγουρα όχι βρουκέλλωση

The facts-4

*The timely and accurate diagnosis of different disease types of human brucellosis, such as **acute, chronic/relapsing, asymptomatic/subclinical, cured/resolved**, continues to be challenging making the decision to “treat or not to treat” difficult in many cases*

Diagnostic difficulties

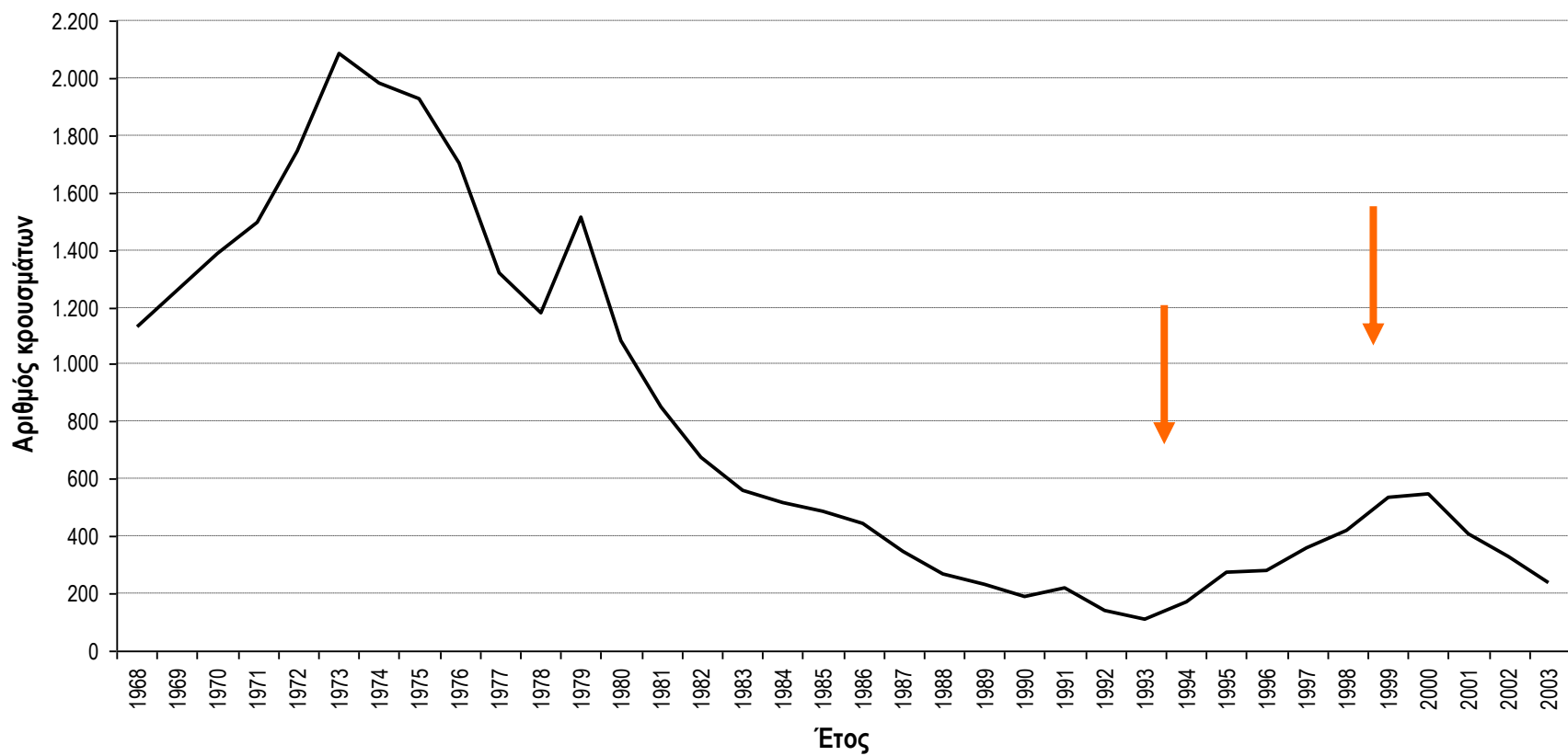
- a) non-specific and atypical clinical features
- b) slow growth rate of *Brucella* in blood cultures, reduced sensitivity of the for detecting chronic cases
- c) the complexity of serodiagnosis of brucellosis, especially in people living in endemic regions, in high risk occupational groups (**livestock workers** and **veterinarians**) and in **previously infected individuals**
- d) long term persistence of brucellar DNA despite appropriate treatment and apparent recovery, making the interpretation of molecular diagnosis with PCR puzzling in many cases

Θεραπεία (όχι μονοθεραπεία)

- δοξυκυκλίνη, ριφαμπικίνη, στρεπτομυκίνη
- τριμεθοπρίμη-σουλφामεθοξαζόλη
- κινολόνες (σιπροφλοξασίνη)
- Παιδιά: ριφαμπικίνη, στρεπτομυκίνη, τριμεθοπρίμη-σουλφामεθοξαζόλη
- Έγκυες, Θηλάζουσες: ριφαμπικίνη, τριμεθοπρίμη-σουλφामεθοξαζόλη

Πρόληψη

- ✓ εκρίζωση της νόσου από τα οικόσιτα και τα εκτρεφόμενα ζώα
- ✓ προγράμματα εμβολιασμών στα ζώα !!!
 - εμβόλια με ζώντα εξασθενημένα στελέχη
(B. abortus S19, B. abortus RB51 και B. melitensis REV-1)
- ✓ παστερίωση του γάλακτος και σωστή παρασκευή/διατήρηση των γαλακτοκομικών προϊόντων
- ✓ προληπτικά μέτρα υγιεινής και προστασίας πρέπει να λαμβάνονται από τους εργαζόμενους σε χώρους υψηλού κινδύνου (κατάλληλη ενδυμασία, ενημέρωση, εκπαίδευση)



ΠΡΟΒΛΗΜΑ

Χρόνιες μορφές

(υποτροπές, άτυπη συμπεριφορά, σύνδρομο χρόνιας κόπωσης)

Μη υποχρεωτικά-δυνητικά ενδοκυττάρια βακτήρια (facultative)

- *Mycobacterium tuberculosis, bovis, leprae, avium*
(και άλλα άτυπα μυκοβακτηρίδια),
- *Salmonella spp*,
- *Shigella spp*,
- *Brucella spp*,
- *Francisella tularensis*,
- *Listeria monocytogenes*,
- *Legionella pneumophila*

Υποχρεωτικά ενδοκυττάρια βακτήρια (obligate)

- *Rickettsia spp*
- *Chlamydia spp*

Μφ: ενδοκυττάριος παρασιτισμός βακτηρίων

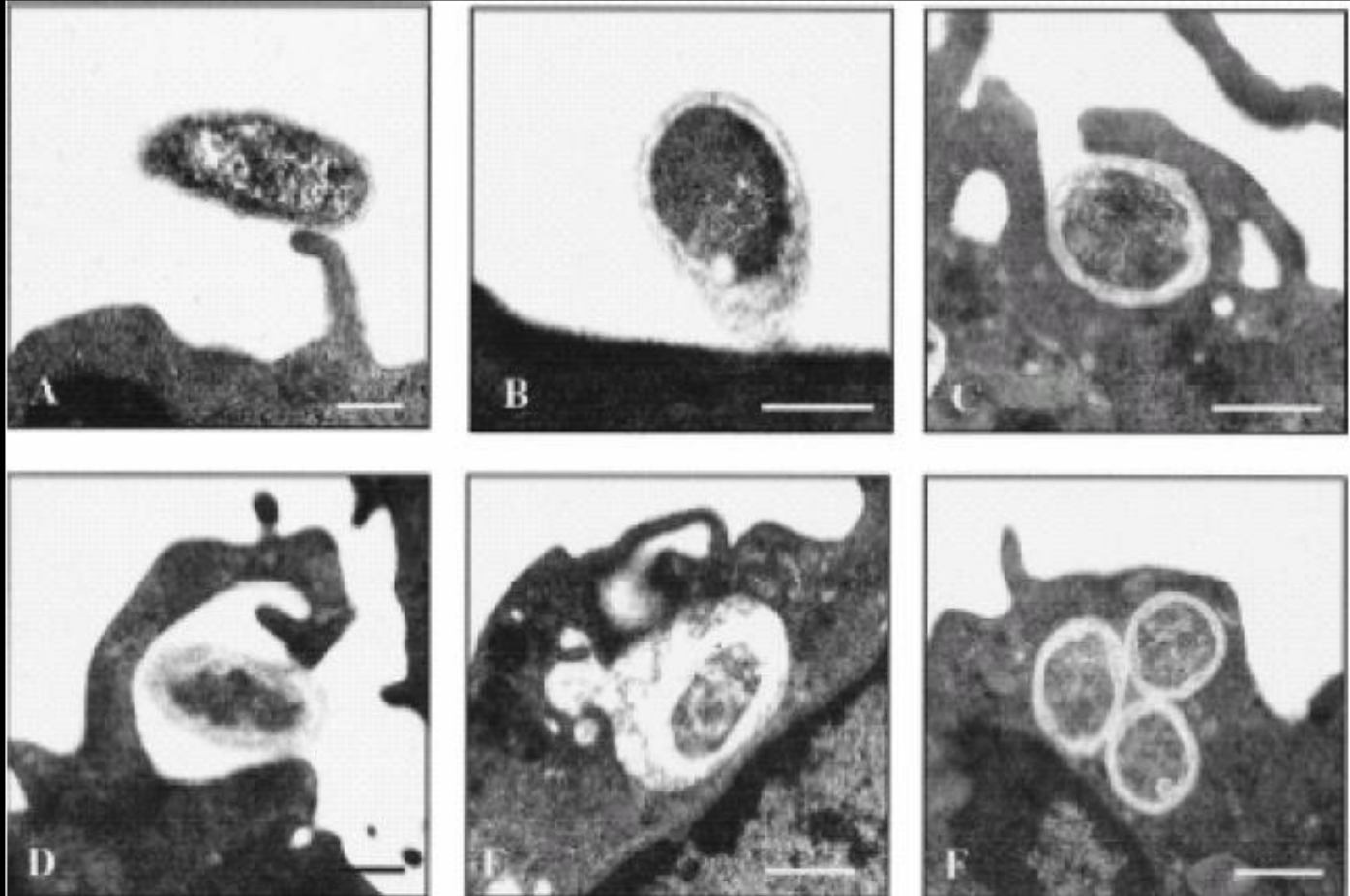
Φαγοσωμάτιο

Mycobacterium
Brucella
Legionella
Chlamydia

Κυτταρόπλασμα

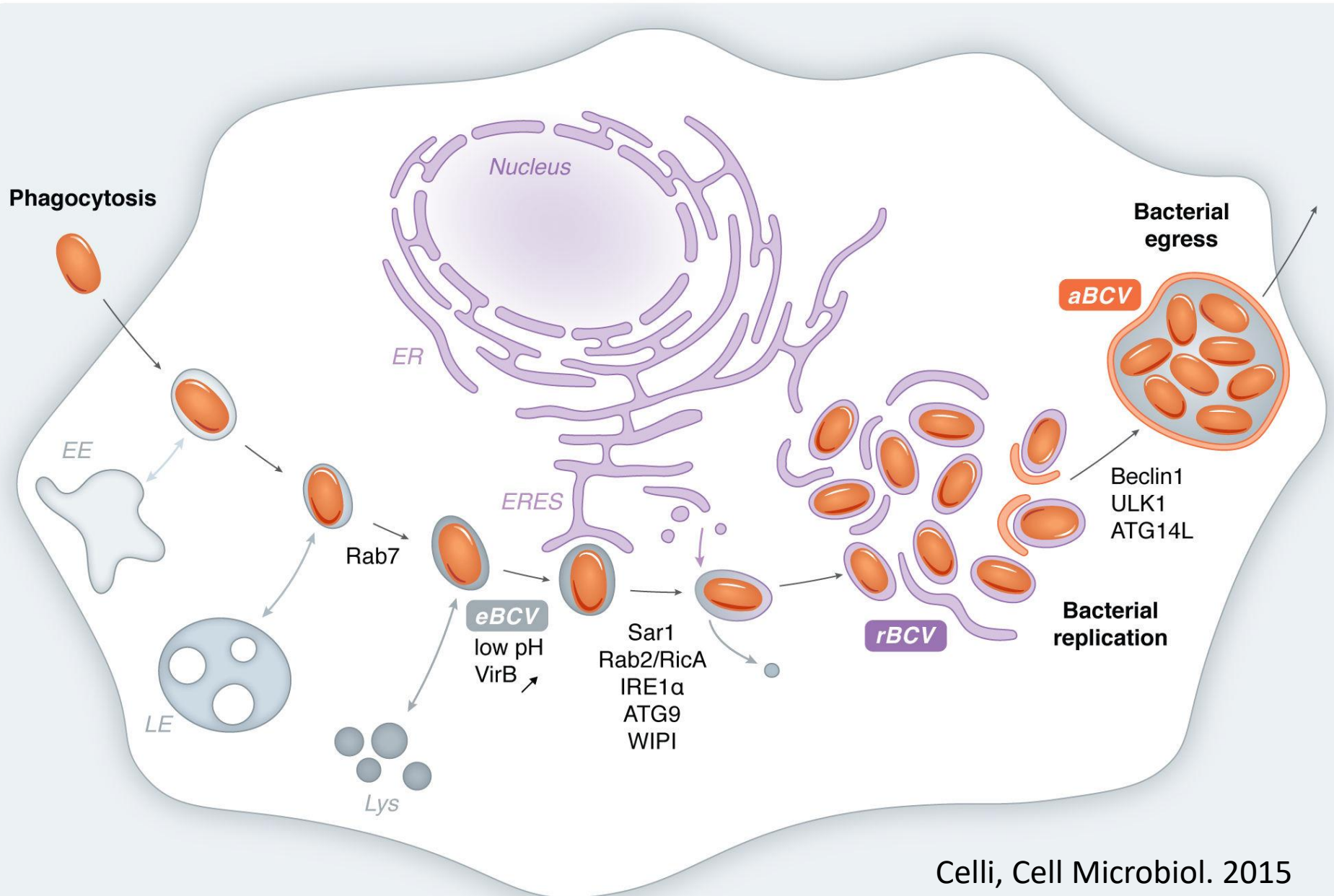
Listeria
Shigella
Rickettsia

Πρόσληψη βρουκέλλας από το Μφ
σχηματισμός φαγοσώματος αναπαραγωγής
(brucellosomes, ενδοκυττάρια θέση παρασιτισμού)



Rittig et al, Infect Immun 2001
Celli, Res Microbiol 2006

Model of Brucella intracellular trafficking in mammalian cells



Η κυτταρική ανοσία είναι
προστατευτική (ενεργοποίηση
μακροφάγων και Τ-λεμφοκυττάρων)

Cheers, Dev Biol Stand, 1984

Araya et al, J Immunol, 1989

Liautard et al, Microbiologia, 1996

Golding et al, Microbes Infect, 2001

Yingst and Hoover, Crit Rev Microbiol 2003

Η κυτταρική απόκριση είναι
Th1 τύπου (IL-2, IFN γ)

Mosmann et al, J Immunol, 1986,

Zhan and Cheers, Infect Immun, 1993

Blay et al AIDS Res Hum Retroviruses, 1992

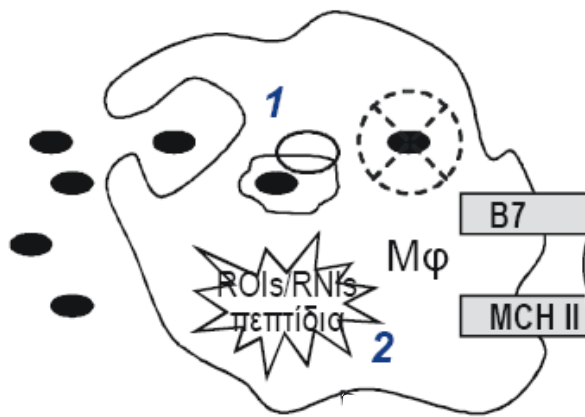
Oliveira et al, Immunology, 1994

Zaitseva et al, Infect Immun, 1995

Oliveira et al, Braz J Med Biol Res, 1998

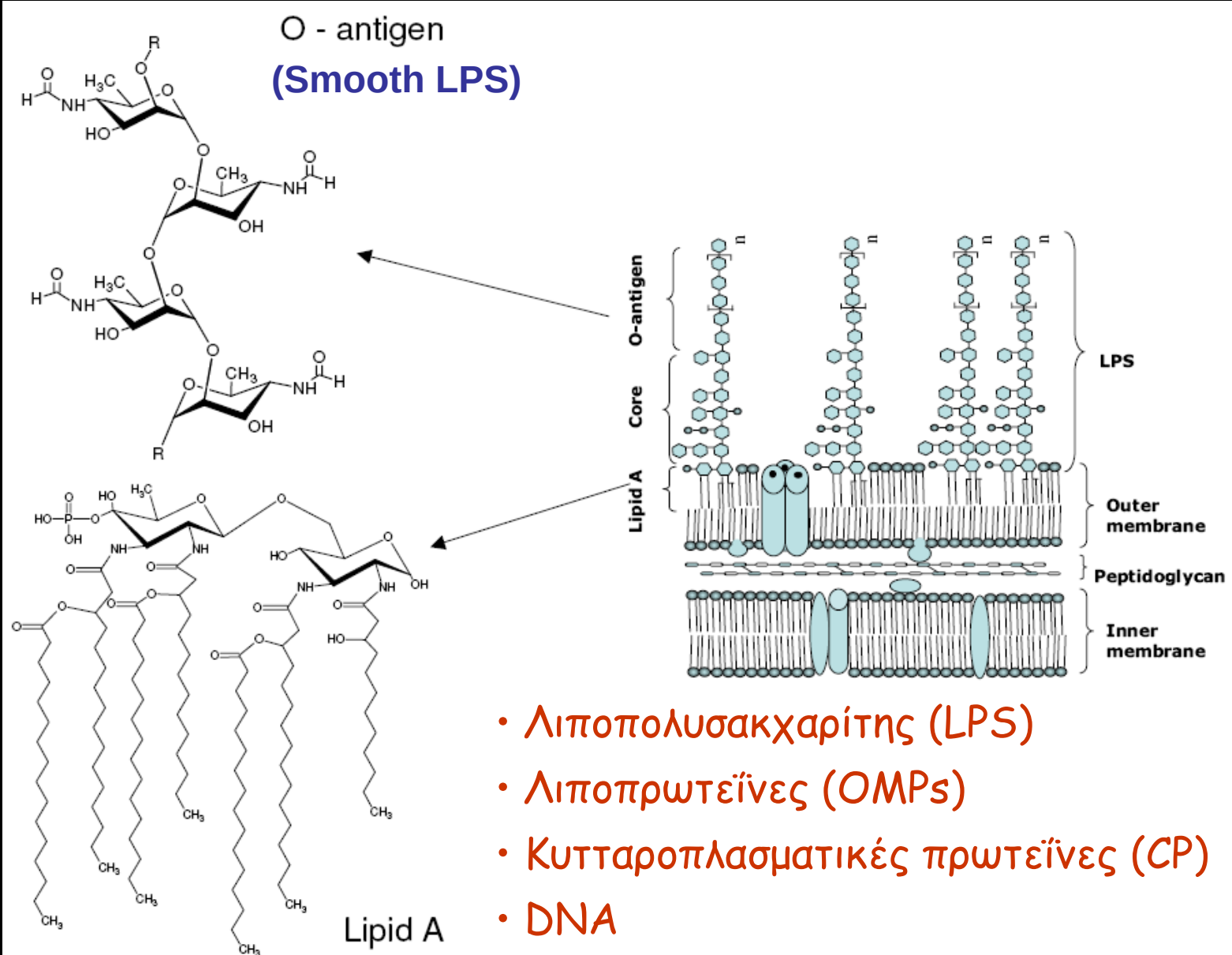
Η ανοσιακή απόκριση στη βρουκέλλωση

Ειδική ανοσία



Φυσική ανοσία

Brucella PAMPs (μοριακές δομές παθογόνου που σχετίζονται με την επιβίωσή του και τη λοιμογόνο δύναμη)



Brucella LPS

Διαφέρει δομικά και λειτουργικά
από το *Salmonella* LPS

εντός



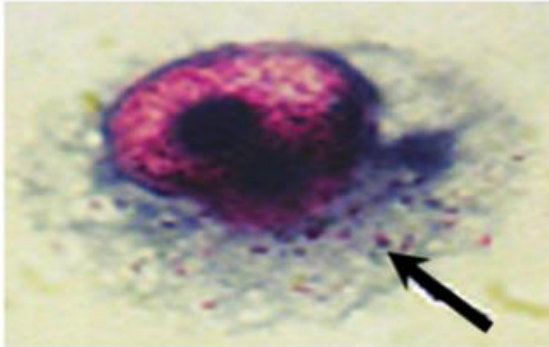
- Παρεμποδίζει την οξειδωτική έκρηξη
- Παρεμποδίζει την έκκριση λυσοσωμικών ενζύμων
- Παρεμποδίζει την παραγωγή IL-1 β , IL-6 και TNF α
- Δεν ενεργοποιεί την εναλλακτική οδό του συμπληρώματος
- Εμποδίζει την εναπόθεση του συμπληρώματος
- Ασκεί προστατευτική δράση έναντι αντιμικροβιακών πεπτιδίων (ντεφενσίνη, η λακτοφερρίνη, η λυσοζύμη)
- Επάγει την παραγωγή IL-10 από τα ανθρώπινα μακροφάγα
- Αναστέλλει την αντιγονοπαρουσίαση (MHC II)
- Μπλοκάρει την ωρίμανση των ΔΚ, και την ΔΚ/Τ αλληλεπίδραση
- Πρώιμο θάνατο των ουδετεροφίλων,
- Δεν προκαλεί απελευθέρωση NETs/NETωση

How Brucella avoids or manipulates host immunity to its own benefit

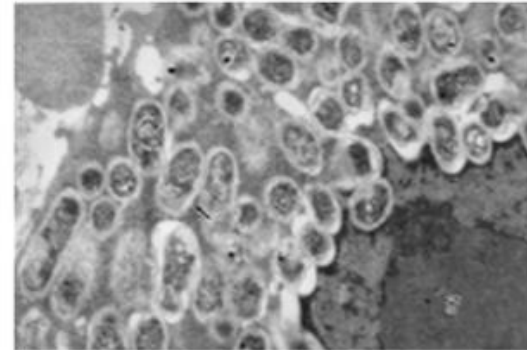
Virulence factor or PAMP	Mode of action	Outcome
Type IV secretion system (<i>virB</i>)	Diversion of intracellular trafficking targeting to replicative niche	Establishment of intracellular parasitism
BvrS/BvrR regulatory system	Control of several systems essential for intracellular trafficking	Establishment of intracellular parasitism
Periplasmic β -cyclic glucan	BCV biogenesis	Establishment of intracellular parasitism
Proline racemase PrpA	T-independent B cell mitogen that stimulates IL-10 secretion	Suppression of cellular immunity (anergy)
Btp1/TcpB	Interfere with TLR2 and TLR4 signalling, blocking of MyD88-induced activation of NFkB	Subversion of innate immune recognition and pro-inflammatory response (stealthy strategy)
	Inhibition of CTL cytotoxicity	Evasion of adaptive immunity
Flagellum	Poor inducer of its cognate receptor TLR5	Escape from innate immune recognition (stealthy strategy)
Lipopolysaccharide (LPS)	Attenuated endotoxic response	Escape from innate immunity and establishment of intracellular parasitism (stealthy strategy)
	Inhibition of phagolysosome fusion	Establishment of intracellular parasitism
	Inhibition of phagocytosis and bactericidal function	Subversion of innate immunity
	Protection from complement attack	Subversion of innate immunity
	Impairment of MHC II antigen presentation	Evasion of adaptive immunity
	Induction of IL-10 production	Suppression of cellular immunity (anergy)
	Interference with TLR4/MD-2 recognition inhibiting DC maturation	Subversion of innate immunity, evasion of adaptive immunity
Lipoprotein Omp19	Inhibition of the expression of MHC-II molecules and antigen presentation to CD4+ T lymphocytes in human monocytes	Evasion of adaptive immunity
	Induction of human T-cell apoptosis	Evasion of adaptive immunity
Lipoprotein Omp25	Down-regulation of TNF α production in human macrophages and DCs	Escape from innate immunity and establishment of intracellular parasitism (stealthy strategy)
?	Defective IFN γ signal transduction in infected human macrophages	Evasion from adaptive immunity
?	Subversion or exploitation of autophagy (xenophagy)	Subversion of innate immunity, establishment of intracellular parasitism and promotion of infection (cell-to-cell spreading)

Επιβίωση και ανάπτυξη βρουκελλών στα μακροφάγα

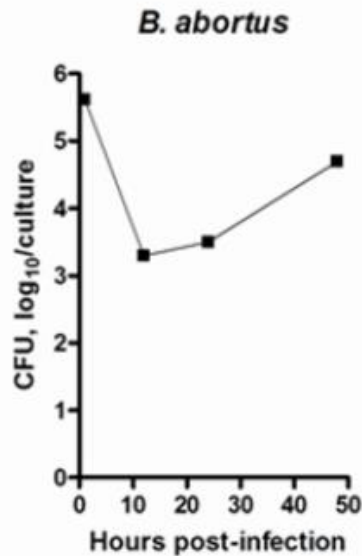
A) 4 hours post-infection



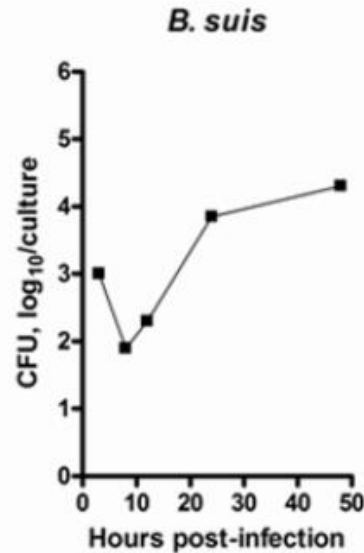
B) 48 hours post-infection



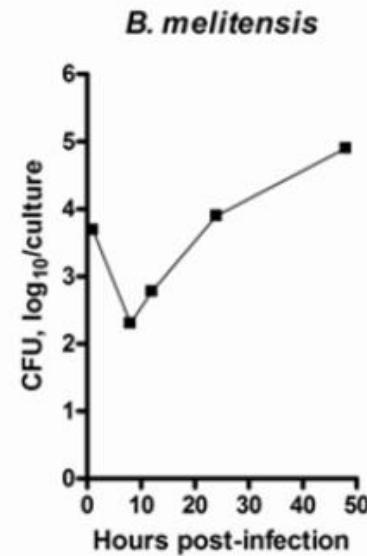
C)



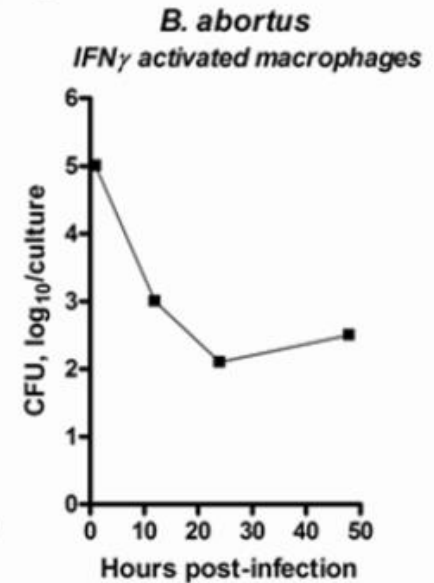
D)



E)



F)



Βρουκέλλωση: Χρόνιος παρασιτισμός επάγει διαταραχή στην κυτταρική ανοσία

P. Skendros et al. / *Microbes and Infection* 13 (2011) 134–142

139

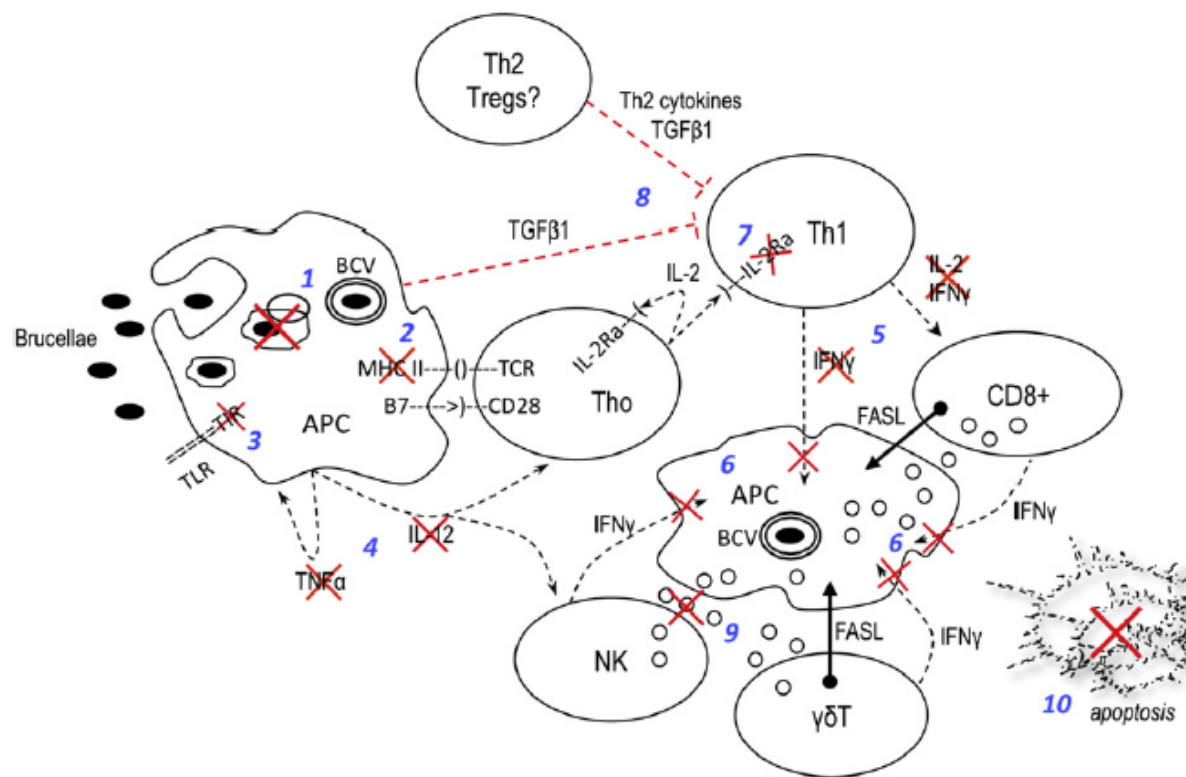


Fig. 1. Proposed effects of chronic *Brucella* infection on human cellular immune mechanisms leading to defective Th1 immune response and anergy. Red lines indicate negative effect. 1) Inhibition of phagolysosome fusion and promotion of BCV formation, 2) Down modulation of antigen presentation, 3) Interfere with TLR signaling, 4) Blockade of TNF α and IL-12 production, 5) Diminished production of IL-2 and IFN γ , 6) Interfere with IFN γ signaling, 7) Low frequency of IL-2Ra positive Th cells, 8) Production of Th2 cytokines (eg IL-10, IL-13) and TGF β 1, 9) Deficient NK cytotoxicity, 10) Prevention of apoptosis. APC = Antigen-Presenting Cell, BCV = *Brucella* Containing Vacuoles, IL-2Ra = IL-2 receptor α , Tho = naïve T-helper cells, Tregs = T regulatory cells, FASL = Fas Ligand. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Brucellosis-acquired cellular anergy: lessons from patients with chronic brucellosis

- disturbance of phagocytosis and migration against nonspecific & disease-specific antigens
- reduced skin reactivity to bacterial antigens
- protracted resistance of monocytes and lymphocytes to apoptosis
- low proliferative responses of lymphocytes to mitogens or *Brucella* antigens
- diminished in vitro production of Th1 cytokines (IFN γ , IL-2) by PBMCs, and elevated TGF β 1 in serum
- reduced CD69+ early activated T lymphocytes
- an increased proportion of CTLs (CD4/CD8 ratio inversion)



Συμπερασματικά...

- ✓ η φυσική ανοσία είναι σημαντική για την ανάπτυξη έγκαιρα μιας επαρκούς, προστατευτικής Th1 απόκρισης, που θα οδηγήσει τελικά στην εκρίζωση των βρουκελλών
- ✓ οι βρουκέλλες φαίνεται ότι κατά την έναρξη της λοίμωξης αναπτύσσουν στρατηγικές που οδηγούν σε μειονεκτική ενεργοποίηση των κυττάρων της φυσικής ανοσίας και ελαττωμένη τοξικότητα έναντι αυτών, έτσι ώστε «σιωπηλά» να αξιοποιούν το περιβάλλον του μακροφάγου και χρονίως να παρασιτούν
- ✓ η μελέτη της ανοσιακής απόκρισης βοηθάει στην καλύτερη κατανόηση των διάφορων κλινικών μορφών της βρουκέλλωσης, που κυμαίνονται από την τυπική οξεία έως την άτυπη χρόνια νόσο



Novel targets for diagnostic stratification and epidemiologic surveillance of human brucellosis: host-guided molecular study in an endemic area at the crossroad between Asia and Europe

Νέοι στόχοι για την διάγνωση και επιδημιολογική επιτήρηση της ανθρώπινης βρουκέλλωσης: μοριακή μελέτη του ξενιστή σε μια ενδημική περιοχή στο σταυροδρόμι Ασίας και Ευρώπης

**Δράση Εθνικής Εμβέλειας «Διμερείς και Πολυμερείς Ε&Τ Συνεργασίες»
«Διμερής και Πολυμερής Ε&Τ Συνεργασία Ελλάδας-Γερμανίας»**



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



HOME

PARTNERS

EVENTS

NEWS

LINKS

CONTACT

BRIDGING Home

BRucellosis IDendification in Greece aNd Germany

Welcome to BRIDGING! A Greek-German Research and Innovation Programme

BRIDGING (**BRucellosis IDendification in Greece aNd Germany**) provides a unique and innovative Greek-German consortium in translational research in human brucellosis, taking advantage of expertise on the fields of molecular immunology, clinical microbiology, system biology and advanced diagnostics.

BRIDGING project aims to bring together Greek and German academic partners with experience and expertise in clinical and laboratory diagnosis and treatment of Brucellosis, with leading researchers in the field of immunology and industrial partners with experience in the development of novel diagnostic tools.

By applying a systems biology approach, we aim to provide an **in-depth analysis of host response to Brucellosis** in an endemic region of EU, in an effort a) to identify molecular targets for the development of new diagnostic assays and algorithms and b) to assess the effect of *Brucella* infection on human immunity and the potential epidemiological impacts.

Brucellosis: an important zoonosis worldwide

A continuously re-emerging zoonosis

[HOME](#)[PARTNERS](#)[EVENTS](#)[NEWS](#)[LINKS](#)[CONTACT](#)

First Department of Internal
Medicine & Laboratory of
Molecular
Hematology, University Hospital
of Alexandroupolis, Democritus
University of Thrace (DUTH)



Institute for Clinical Chemistry
and Laboratory Medicine,
Faculty of
Medicine, Technische
Universität Dresden (TUD)



P. Zafiropoulos S.A. (PZAF)



Paul Langerhans Institute
Dresden (PLID)



ENG

17:19
4/6/2019

The challenge...



***Integrated molecular data and methods
that characterize different clinical types/forms of human
brucellosis and the impact of Brucella on host immunity
are missing today***

The scope and objectives of BRIDGING

Bring together academic and industrial partners with experience in the diagnosis and treatment of brucellosis and expertise in inflammation and cutting edge technologies in an effort

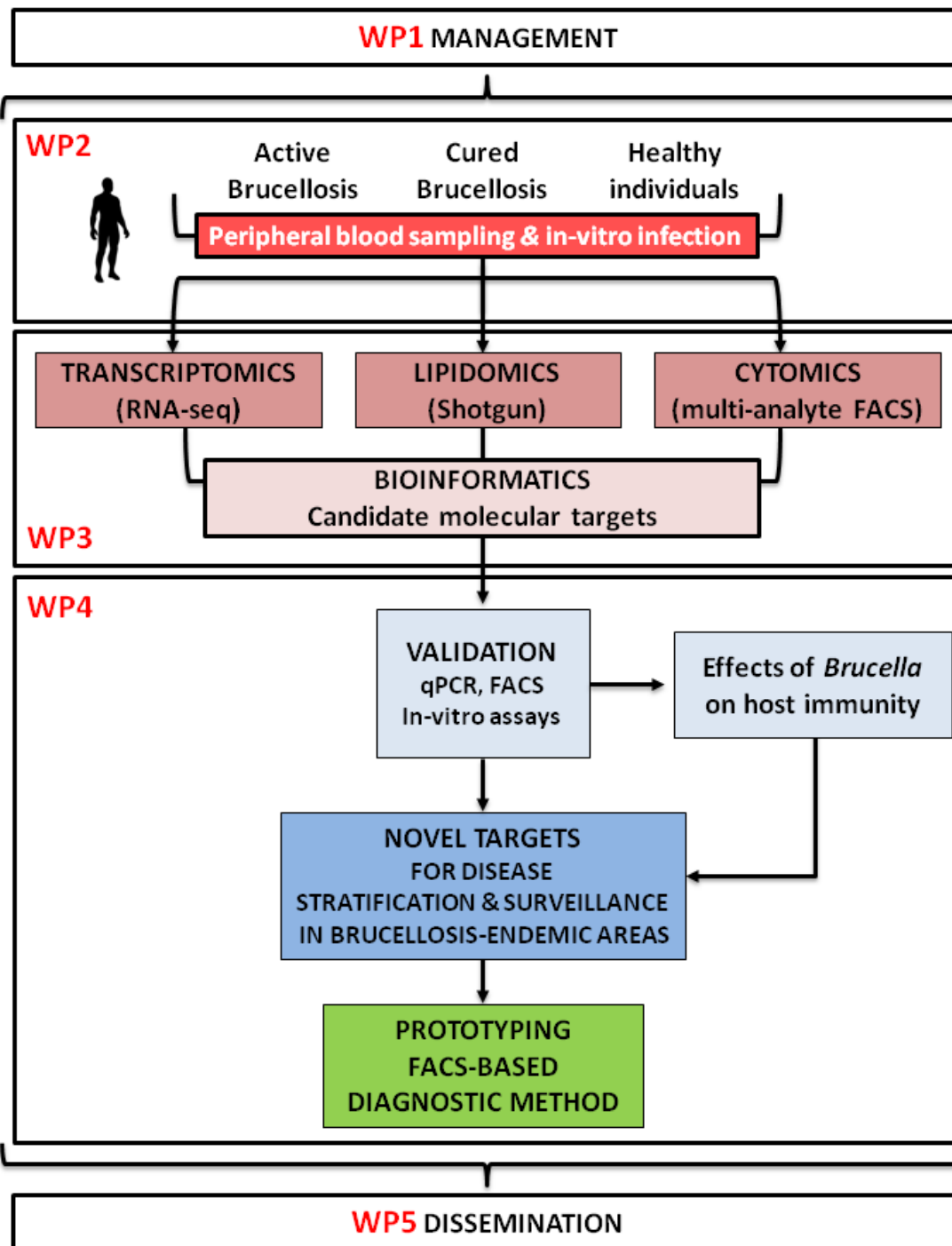
- (a) to provide an in depth analysis of host response to Brucella by applying high-throughput molecular and cellular analysis**
- (b) to increase the alertness of the medical/vet community**

- ✓ *Identify novel molecular targets for the diagnosis, stratification and epidemiologic surveillance of different types of human brucellosis, especially in endemic regions*
- ✓ *Investigate the possible impact of brucellosis on population health by assessing the effect of Brucella on key host innate immune circuits (including the novel concept of trained immunity/innate memory)*
- ✓ *Provide the principles of a novel flow cytometry-based diagnostic assay for active brucellosis*
- ✓ *Increase medical/vet community awareness on brucellosis and initiate a long-term co-operation between the partners*

BRIDGING project novelty:



- Use a system biology approach by combined various emerging omics technologies providing **an integrated approach on the interplay between host immunity and Brucella**
- Allow a better, **molecular-based, characterization and stratification of different types of human brucellosis**, including resolved disease in high risk populations and endemic regions
- **Transfer this knowledge in industry and provide the prototypes for a novel diagnostic assay** based on advanced flow cytometry, for **rapid and accurate diagnosis of active (acute or chronic) brucellosis**



**ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΟ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗΣ ΚΡΟΥΣΜΑΤΟΣ ΒΡΟΥΚΕΛΛΩΣΗΣ
(ΜΕΛΙΤΑΙΟΥ ΠΥΡΕΤΟΥ)**

Το ερωτηματολόγιο αυτό έχει σκοπό να συμβάλει στην ανεύρεση του πιθανού αγωγού μετάδοσης του νοσήματος του μελιταίου πυρετού και στην προάσπιση της δημόσιας υγείας. Παρακαλούμε να απαντηθούν όλες οι ερωτήσεις.

Ενότητα Α: Δημογραφικά Χαρακτηριστικά

Επώνυμο Όνομα
Τηλέφωνο.....
1.1) Ηλικία ετών ή 1.2) Έτος γέννησης
2) Φύλο: ☐ Άρρεν ☐ Θήλυ
3) Τόπος κατοικίας (χωριό ή πόλη): Νομός
4) Έχετε αρρωστήσει στο παρελθόν ξανά με βρουκέλλωση (μελιταίο πυρετό);
☐ Όχι ☐ Ναι ☐ Δεν γνωρίζω
αν ναι τότε περίπου:.....

Ενότητα Β: Κλινική Εικόνα

5) Παρουσιάσατε κάποια από τα παρακάτω συμπτώματα;

Πυρετός ☐ Όχι ☐ Ναι
Νυκτερινές εφιδρώσεις ☐ Όχι ☐ Ναι
Αρθραλγία ☐ Όχι ☐ Ναι
Οσφυαλγία ☐ Όχι ☐ Ναι
Κεφαλαλγία ☐ Όχι ☐ Ναι
Αίσθημα κόπωσης ☐ Όχι ☐ Ναι

Ημερομηνία έναρξης συμπτωμάτων ____/____/____ (ημερομηνία / μήνας / έτος)*

*Προσπαθήστε να θυμηθείτε πότε αρχίσατε να μη νιώθετε καλά και να εμφανίζονται κάποια (ή όλα) από τα παραπάνω συμπτώματα

Ενότητα Γ: Διερεύνηση

Υπάρχει σύνδεση με άλλο κρούσμα; ☐ Όχι ☐ Ναι

Αν Ναι ονοματεπώνυμο κρούσματος /κρουσμάτων

(1)..... (2).....
(3)..... (4).....

Ι. ΕΠΑΦΗ ΜΕ ΖΩΑ

6) Έχετε στην κατοχή σας 1 ☐ πρόβατα 2 ☐ αίγες 3 ☐ βοοειδή 4 ☐ χοίρους
5 ☐ Άλλο (Περιγράψτε)..... 6 ☐ δεν υπάρχουν ζώα

Τους τελευταίους 2 μήνες πριν την έναρξη των συμπτωμάτων :

7) Ήρθατε σε επαφή με αγροτικά ζώα; ☐ Όχι ☐ Ναι

8) Με τι είδους ζώα; 1 ☐ πρόβατα 2 ☐ αίγες 3 ☐ βοοειδή 4 ☐ χοίρους
5 ☐ άλλο.....

9) Ήρθατε σε επαφή με σκύλο; ☐ Όχι ☐ Ναι

10) Επισκεφθήκατε περιοχή με αγροτικά ζώα; ☐ Όχι ☐ Ναι

11) Βρεθήκατε σε περιβάλλον εκτροφής ζώων; ☐ Όχι ☐ Ναι

12) Χειριστήκατε κοπριά (π.χ. για κηπουρικές εργασίες) ☐ Όχι ☐ Ναι
Αν Ναι, η κοπριά ήταν από:

1 ☐ πρόβατα 2 ☐ αίγες 3 ☐ βοοειδή 4 ☐ χοίρους 5 ☐ δεν ξέρω

Περιγράψτε.....

13.1) Καταναλώσατε ατελώς ψημένο κρέας;

☐ Όχι ☐ Ναι

13.2) Ετοιμάσατε γεύμα ή ήρθατε σε επαφή με σφάγιο αγριογούρουνου ή λαγού ή ελαφιού (π.χ. κατά τη διάρκεια κυνηγιού ή που αγοράστηκε από κρεοπωλείο) ;

☐ Όχι ☐ Ναι

14) Η εργασία σας έχει σχέση με αγροτικά ζώα ή προϊόντα από αυτά (εργασία σε εκτροφή αγροτικών ζώων (κατσίκια πρόβατα κλπ.), κτηνοτρόφος, γαλακτοβιομηχανία, τυροκομείο, σφαγείο, κρεοπωλείο, κρεατοβιομηχανία, κτηνίατρος κλπ.)

☐ Όχι ☐ Ναι

Αν Ναι, περιγράψτε

☐ Κτηνοτρόφος

☐ Αγρότης

☐ Κτηνίατρος

☐ Τυροκόμος

☐ Κρεοπώλης

☐ Σφαγέας

☐ Άλλο (περιγράψτε).....

II. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΜΕΤΑΔΟΣΗ

Τους τελευταίους 2 μήνες πριν την έναρξη των συμπτωμάτων :

15) Εργαζόσαστε σε μικροβιολογικό εργαστήριο; ☐ Όχι ☐ Ναι

16) Είχατε πιθανή επαφή με το μικρόβιο του μελιταίου πυρετού; ☐ Όχι ☐ Ναι

III. ΑΙΜΑΤΟΓΕΝΗΣ ΜΕΤΑΔΟΣΗ

Τους τελευταίους 2 μήνες πριν την έναρξη των συμπτωμάτων :

17) Αν δεχτήκατε μετάγγιση ή μεταμόσχευση οργάνου ή ιστού σημειώσατε:

☐ αίματος ή προϊόντων αίματος

☐ μυελού οστών

☐ οργάνου

☐ άλλο

IV. ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Τους τελευταίους 2 μήνες πριν την έναρξη των συμπτωμάτων :

18) Καταναλώσατε γαλακτοκομικά προϊόντα (όπως φέτα, γάλα, γιαούρτι, τζατζίκι, παγωτό ή άλλο γαλακτοκομικό προϊόν); ☐ Όχι ☐ Ναι

Αν Ναι, τότε απαντήστε στην επόμενη ερώτηση

19) Καταναλώσατε γαλακτοκομικά που προέρχονταν από βοσκό, κτηνοτρόφο, μικρό παραγωγό ή τοπικό τυροκομείο; ☐ Όχι ☐ Ναι

Αν Ναι, ήταν

☐ τοπικό γαλακτοκομικό προϊόν, φρέσκο τυρί, φρέσκια φέτα, κλπ.

☐ φέτα

☐ γάλα

☐ γιαούρτι

☐ άλλο

(Περιγράψτε το προϊόν)

Από που /ποιον/ ποιο κατάστημα (όνομα καταστήματος, διεύθυνση, τηλέφωνο) το προμηθευτήκατε;

Πότε το φάγατε ή αρχίσατε να το τρώτε;.....

20) Αν κάποια γαλακτοκομικά που καταναλώσατε ήταν γνωστής μάρκας σημειώσατε:

☐ φέτα, μάρκας.....

Πότε το φάγατε ή αρχίσατε να το τρώτε;.....

☐ γάλα, μάρκας.....

Πότε το φάγατε ή αρχίσατε να το τρώτε;.....

☐ γιαούρτι, μάρκας.....

Πότε το φάγατε ή αρχίσατε να το τρώτε;.....

☐ τζατζίκι, μάρκας.....

Πότε το φάγατε ή αρχίσατε να το τρώτε;.....

☐ άλλο (περιγράψτε)

μάρκας.....

Πότε το φάγατε ή αρχίσατε να το τρώτε;.....

21) Υπήρχαν άλλοι που μπορεί να συμμετείχαν μαζί σας σε κοινό γεύμα που περιείχε γαλακτοκομικά;

☐ Όχι ☐ Ναι ☐ Δεν ξέρω

Αρρώστησαν ένας ή περισσότεροι από αυτούς με μελιταίο πυρετό;

☐ Όχι ☐ Ναι ☐ Δεν ξέρω

Αν Ναι, πόσοι αρρώστησαν;

Ποια ήταν η σχέση τους με εσάς; (συγγενική, φιλική κλπ.)

Πότε (περίπου) έλαβε (έλαβαν) χώρα το κοινό (κοινά) γεύμα (γεύματα) με γαλακτοκομικά;

Στοιχεία επικοινωνίας για τα άτομα που αρρώστησαν με μελιταίο σε κοινά γεύματα;

α Όνομα /Επώνυμο..... Διεύθυνση κατοικίας.....

Τηλέφωνο.....

β Όνομα /Επώνυμο..... Διεύθυνση κατοικίας.....

Τηλέφωνο.....

γ Όνομα /Επώνυμο..... Διεύθυνση κατοικίας.....

Τηλέφωνο.....

Τυχόν σχόλια.....

Όνοματεπώνυμο

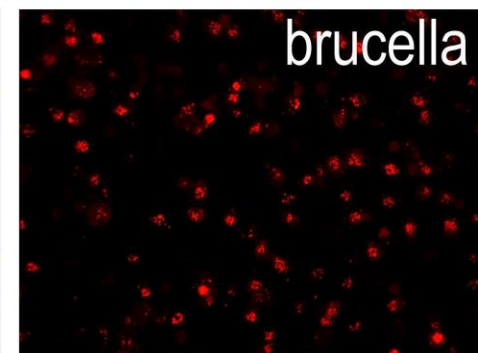
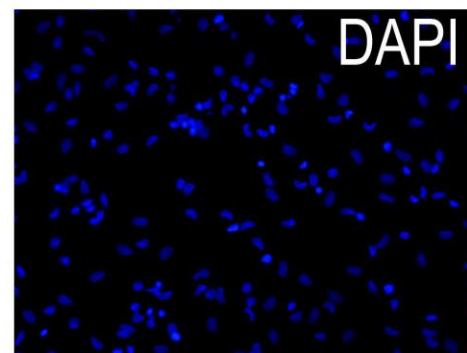
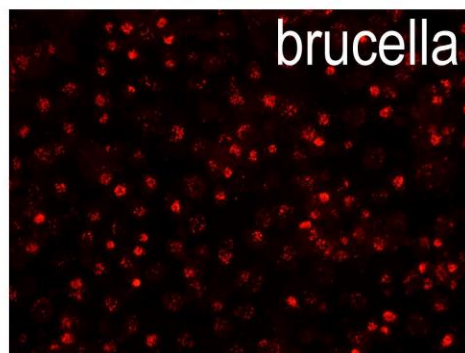
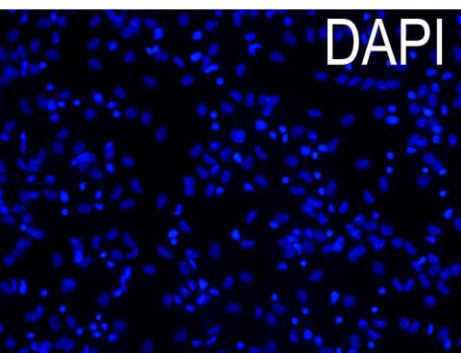
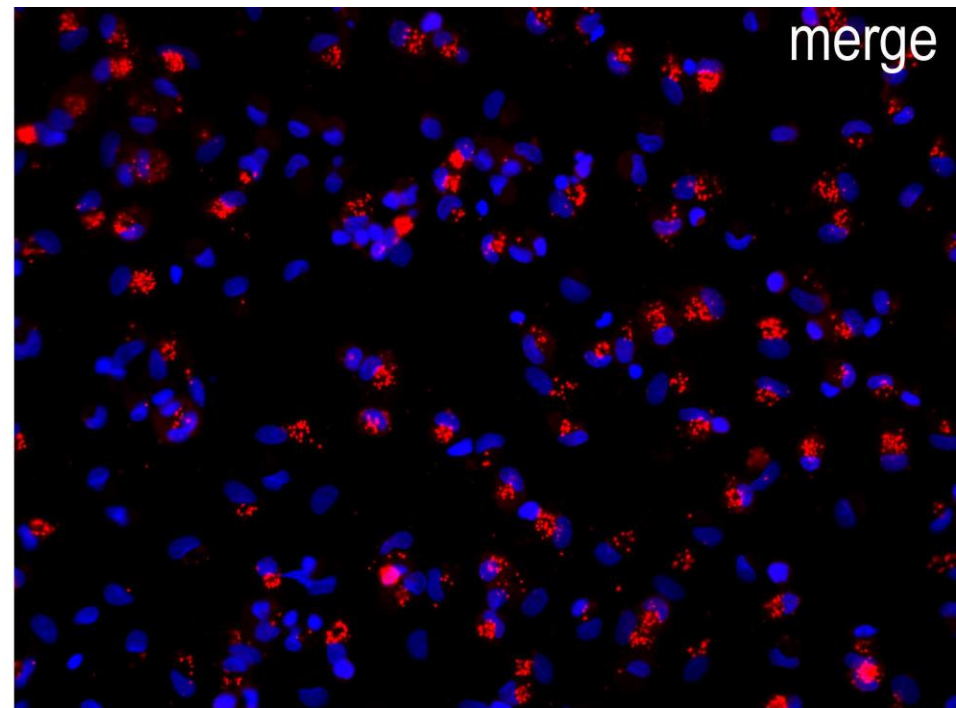
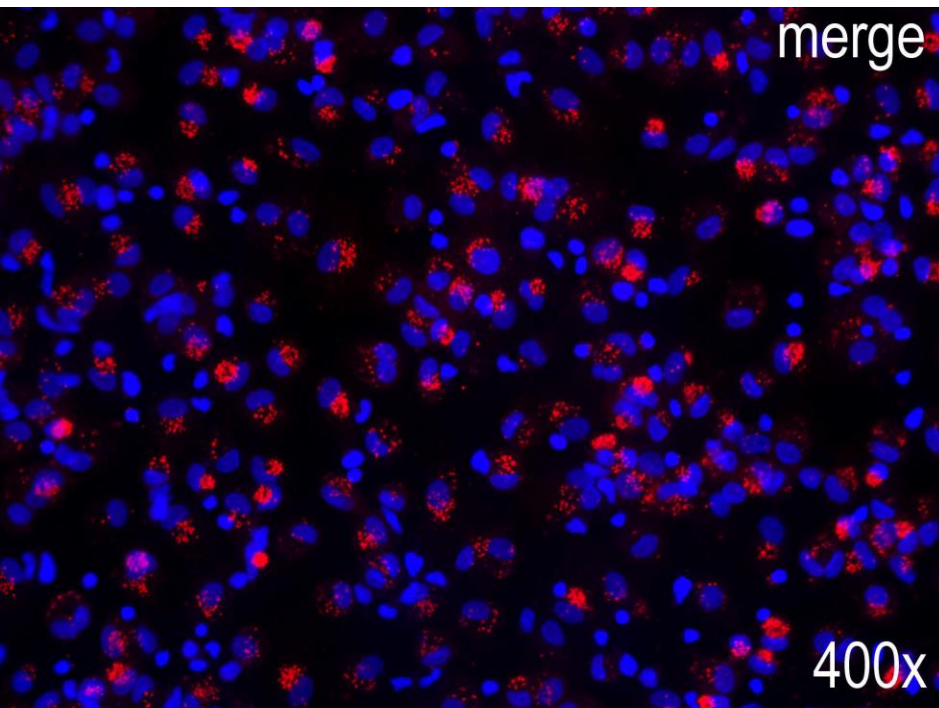
Υπογραφή

Τηλέφωνο επικοινωνίας

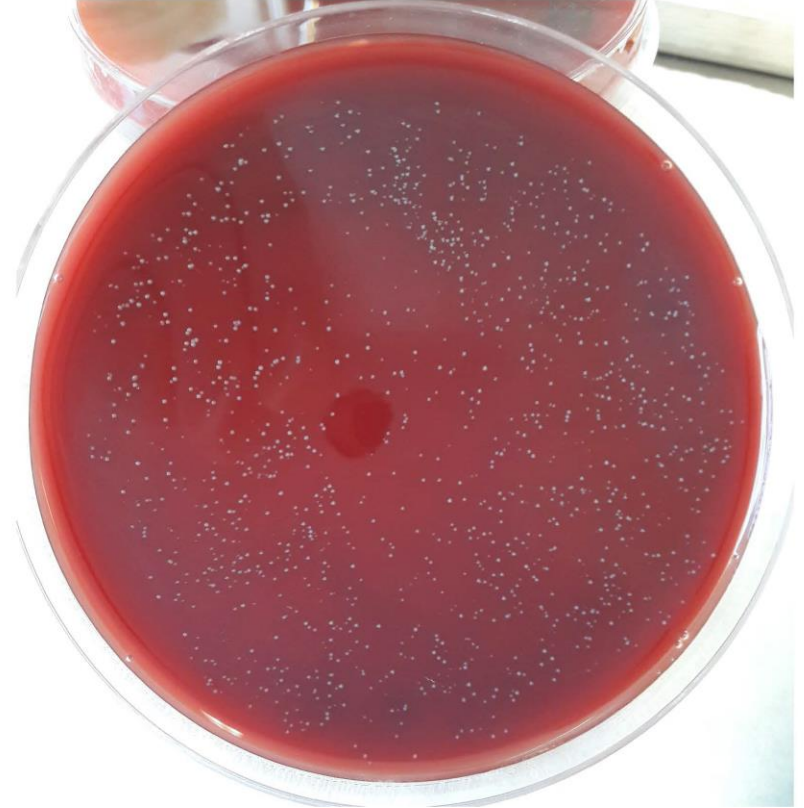
Όνοματεπώνυμο, υπογραφή και τηλ. επικοινωνίας του διενεργήσαντος τη διερεύνηση

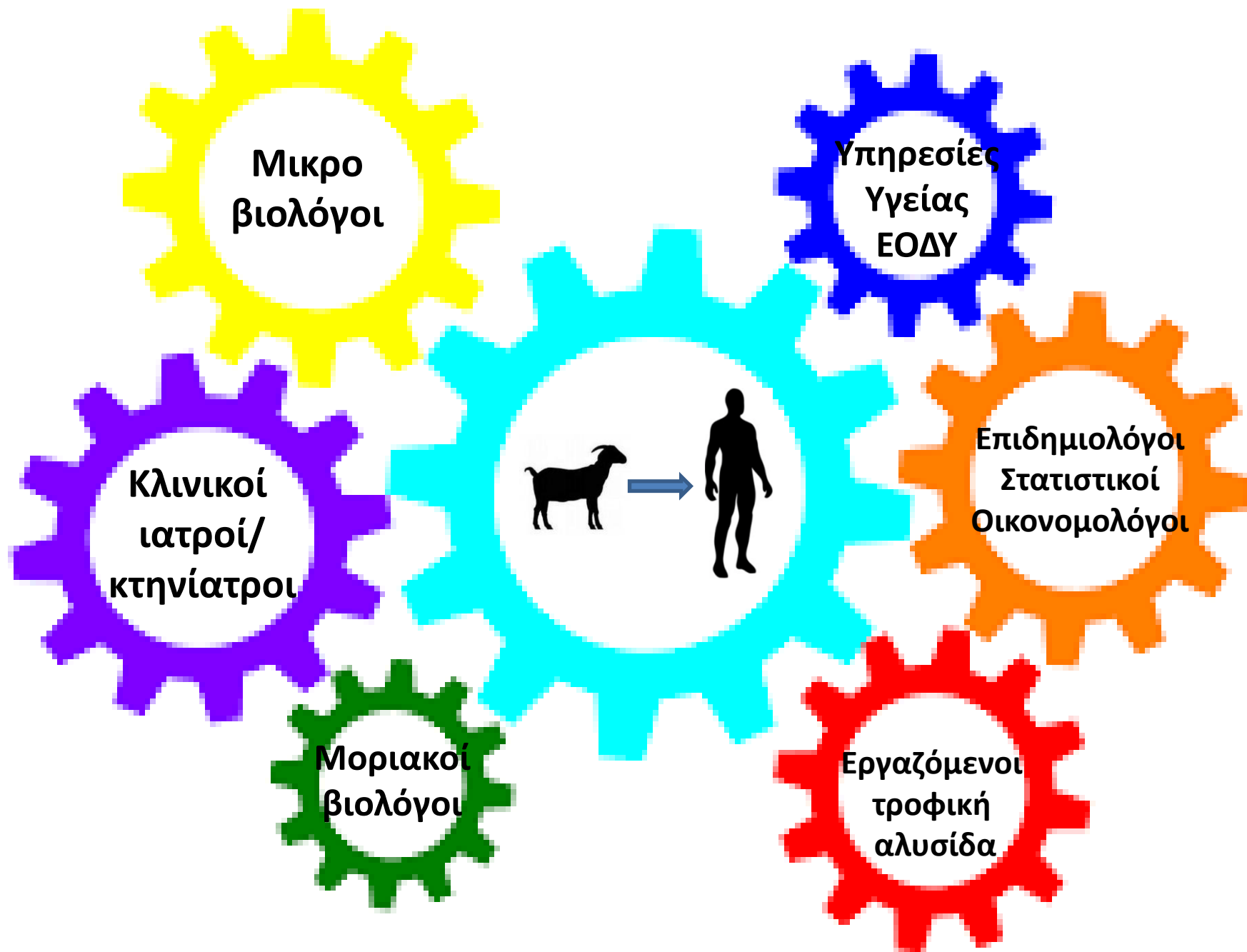
Macrophages derived from 2 healthy volunteers' monocytes

In vitro infection with clinical strain of Brucella



CFUs of Brucella following lysis of *in vitro* infected macrophages





**Α' Παθολογική Κλινική
& Εργαστήριο Μοριακής Αιματολογίας
Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης**

Κ. Ρίτης

Α. Χρυσανθοπούλου

Β. Τσιρωνίδου

Α. Αραμπατζιόγλου

Α. Μήτσιος

Η. Αγγελίδου

Π. Σκένδρος

**Εργαστήριο Μικροβιολογίας
Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης**

Μ. Πανοπούλου

Θ. Κωνσταντινίδης

Π. Ζαφειρόπουλος ΑΕ

Γ. Λαλλάς

Χ. Μπακατσέλου

Θ. Ζαφειρόπουλος

**Institute for Clinical Chemistry and
Laboratory Medicine,
Faculty of Medicine,
Technische Universität Dresden**

I. Mitroulis

T. Chavakis

Paul Langerhans Institute Dresden
Unal Coskun

