

## ΕΝΗΜΕΡΩΤΙΚΟ ΔΕΛΤΙΟ 33 – ΜΑΡΤΙΟΣ 2020

### ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

- NaME-PrO-assisted ARMS (NAPA): a novel approach for the improvement of ARMS-PCR specificity in liquid biopsies
- Διαχείριση των επικίνδυνων υγρών αποβλήτων των Υγειονομικών Μονάδων
- Η πρόοδος της ανάλυσης του DNA και η επίλυση του μυστηρίου, γύρω από το τέλος των Ρομανώφ

### World Health Organization (WHO): coronavirus disease 2019 (COVID-19) situation report/



“Οι αστραπές φωτίζουν το βραδινό τοπίο, ο απόηχος του κεραυνού απλώνεται στις λαγκαδιές... Ποτέ τίποτα δεν επαναλαμβάνεται στην ιστορία, ... κάθε γεγονός είναι ανεπανάληπτο. Οτιδήποτε φαίνεται εκ πρώτης όψεως το ίδιο, μόλις που μοιάζει. Όλα συμβαίνουν πάντοτε και ποτέ, όλα επαναλαμβάνονται στο άπειρο και ουδέποτε”.

Ερευνητές στις ΗΠΑ, σχεδιάζοντας με βάση έναν εξελικτικό αλγόριθμο τεχνητής νοημοσύνης και χρησιμοποιώντας πολυδύναμα βλαστοκύτταρα εμβρύων βάτραχου *Xenopus laevis*, κατασκεύασαν εντελώς νέες μορφές ζωής, που δεν υπάρχουν στη φύση, τα xenobots, τα πρώτα διαμορφώσιμα έμβια ρομπότ. Από κυτταρική και γενετική άποψη τα xenobots είναι βάτραχοι, μολονότι δεν είναι. Ποιά είναι τα οφέλη και ποιά τα ηθικά θέματα που ανακύπτουν; Παράλληλα ο κορωνά - ιός COVID-19 σουλατσάρει στο παγκόσμιο στερέωμα αφήνοντας τα θλιβερά διαπιστευτήριά του και εξόρισε τα ταξίδια, την ανεμελιά – όση μας είχε απομείνει, τα καρναβάλια – φέρνει όμως τις δικές του μάσκες, στραβοκοιτάζει τις εθνικές οικονομίες και... μειώνει τις εκπομπές CO<sub>2</sub>. “Ο θαυμαστός καινούργιος κόσμος” είναι εδώ;

Σε αυτό το τεύχος διαβάστε τη βραβευμένη προφορική ανακοίνωση στο 17ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Χημείας του περασμένου Νοεμβρίου, για τη βελτίωση της ειδικότητας της ARMS-PCR και τις εφαρμογές της στην υγρή βιοψία, ενημερωθείτε για τις πρόσφατες εξελίξεις στη διαχείριση των επικίνδυνων υγρών αποβλήτων των Υγειονομικών Μονάδων και παρακολουθείστε ταξιδεύοντας στο χρόνο, την πρόοδο της ανάλυσης του DNA και την επίλυση του μυστηρίου, γύρω από το τέλος των Ρομανώφ.

*Ανδριανή Γρηγοράτου.*

- Ντανίλο Κις (*Subotica 1935–Παρίσι 1989*). *Εγκυκλοπαίδεια των νεκρών*. Μτφ. Χρ. Αρβανιτιδής. Εκδ. Εξάντας, 1993.
- S. Kriegman, D. Blackiston, M. Levin, J. Bongard. A scalable pipeline for designing reconfigurable organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, PNAS first published Jan. 13, 2020. <https://doi.org/10.1073/pnas.1910837117>
- <https://www.theguardian.com/science/2020/jan/13/scientists-use-stem-cells-from-frogs-to-build-first-living-robots> και <https://www.theguardian.com/books/2020/jan/16/xenobot-word-of-the-week>
- *Statement in support of the scientists, public health professionals, and medical professionals of China combatting COVID-19*. *Lancet*, Feb. 19, 2020. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30418-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30418-9)
- *Θαυμαστός καινούργιος κόσμος*, (*Brave New World 1932*), Aldous Huxley ( 1894-1963), Μτφ. Ελ. Κυπραίου, Εκδ. Κάκτος, 1980.

## **NaME-PrO-assisted ARMS (NAPA): a novel approach for the improvement of ARMS-PCR specificity in liquid biopsies**

Athina Markou<sup>1</sup>, Elena Tzanikou<sup>1</sup>, Ioannis Ladas<sup>2</sup>, G. Mike Makrigiorgos<sup>2</sup>, Evi Lianidou<sup>1</sup>

1. Analysis of Circulating Tumor Cells, Laboratory of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, University of Athens, Athens, Greece.
2. Department of Radiation Oncology, Dana-Farber Cancer Institute and Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA

### **INTRODUCTION**

Liquid biopsy is considered today as one of the most promising approaches for the management of cancer patients; it is mainly based on the analysis of Circulating Tumor Cells (CTCs), circulating tumor DNA (ctDNA), circulating miRNAs and exosomes (1). The evaluation of mutational status of specific genes in liquid biopsy material can be very informative, but requires highly sensitive and robust methodologies. Detection of DNA mutations in liquid biopsy samples provides a powerful tool for the management of cancer patients (2-4). However, the limited amount of circulating cell free DNA (cfDNA) and the excess amount of circulating wild-type (wt) DNA obtained through a standard blood draw are persistent issues that often compromise the diagnostic results.

The amplification-refractory mutation system (ARMS) is a simple approach for detecting any mutation involving single base changes or small deletions, since Taq DNA polymerase is very effective at distinguishing between a match and a mismatch at the 3'-end of a PCR primer. When the primer is fully matched to the template, the amplification proceeds with full efficiency but when the 3'-base is mismatched, amplification is inefficient. Hence primers matched to the mutated allele can amplify the mutant alleles at the expense of WT alleles. ARMS is probably the most commonly used method for low-level mutation detection (5) and has been used clinically for many years as an FDA approved assay for detecting KRAS mutations (6). However, when using ARMS primers in most cases inefficient priming still occurs on the WT sample, yielding a late 'background Cq', originating from wt DNA i.e. false positive results. It is highly desirable to correct for this well-known ARMS defect especially in liquid biopsy applications where a high sensitivity is required.

Nuclease-assisted Minor Allele Enrichment using Overlapping probes (NaME-PrO) (7), is an enzymatic approach to remove wt DNA from multiple DNA targets selected at will, prior to DNA amplification, after which current genomic analysis processes remain substantially unchanged. In NaME-PrO, after DNA denaturation, the temperature is reduced to allow addition of a thermostable double-stranded DNA Duplex specific nuclease (DSN) and mutation-overlapping oligonucleotide probes that guide nuclease digestion to the selected WT DNA sequences.

Here we present a new, combined approach, NAPA: NaME-PrO-assisted ARMS for bypassing the known ARMS defect (ie generation of false positives) to enable an assay with high specificity by adding a brief enzymatic step just prior to ARMS. This novel methodology is based on a combination of NAME-PrO, multiplex ARMS-PCR and melting analysis. By using NAME-PrO, we remove wt DNA from DNA targets and we avoid the inefficient priming of ARMS primers and the false positive signal that results from this false priming. Moreover, due to the different size of the designed PCR products we managed to discriminate and identify each of two specific *PIK3CA* hotspot mutations simultaneously, by melting analysis.

We selected as a novel pilot application system the detection of *PIK3CA* mutations in CTCs and ctDNA. *PIK3CA* (PI3K catalytic subunit) somatic mutations are very frequent in human cancers and play a crucial role in response to molecular-targeted therapies (8). The importance of individual *PIK3CA* mutations as predictors of sensitivity and resistance to targeted therapies lead to the use of novel PI3K/mTOR/AKT inhibitors as "personalized" treatment (9, 10). *PIK3CA* mutations have been reported in 18%–40% (11) of BrCa cases; three 'hot-spot' mutations (E542K, E545K and H1047R) comprise more than 80% (12) of all *PIK3CA* mutations and are localized in exons 9 and 20. *PIK3CA* mutational status has already been studied in CTCs (13-16) and plasma- ctDNA (17,18). According to these studies, the percentage of *PIK3CA* hotspot mutations in CTC and plasma-ctDNA is around 30-40%. Here we show that NAPA represents a time- and labor- saving as well as cost-efficient method that is readily and broadly applicable in clinical molecular diagnostic laboratories.

## **EXPERIMENTAL SECTION**

**Clinical Samples:** We analyzed a total of 61 samples: 24 DNAs isolated from EpCAM-positive CTC fractions and 17 ctDNA samples isolated from plasma of breast cancer patients with clinically confirmed metastasis. Peripheral blood from 10 healthy female volunteers, collected for specificity studies, was processed by using the same procedure as used for patient's samples.

Thus, we analyzed 10 DNAs isolated from EpCAM-positive fractions and 10 ctDNA samples isolated from plasma of healthy volunteers.

**Primer and Probe designs:** For each DNA target interrogated for mutations, a distinct pair of oligonucleotide probes overlapping the target region was designed. Probes were designed to be comprised of 20–25 bp oligonucleotides in a way that they have a  $T_m$  of an average 65°C and a range of 63–67°C when they are fully matched to wt DNA. NAME-PRO probes are designed to bind respectively to the top and bottom DNA template strands with an overlap ‘target’ region of about 10–15 bp. These probes can optionally contain a polymerase block on their 3’ end to prevent polymerase extension in subsequent amplification reactions. Probe to probe interactions including those from top and bottom strand overlap were designed to have a  $T_m$  of < 50°C. Integrated DNA Technologies OligoAnalyzer 3.1 software was used to calculate probe  $T_m$ .

**NAME-PRO assay:** NAME-PRO reaction was performed as previously described (6). A total of at least 10 ng genomic DNA for each sample and overlapping oligonucleotides (probes) were mixed in 1× DSN (Evrogen) buffer to a final 10 µl volume, probe (concentration: 100 nM), and then the sample was placed in a Thermal Cycler (MJ Cycler) for denaturation at 98°C for 2 min. The temperature was then reduced to 63°C and 0.5 units of DSN (Evrogen) was added into the mixture followed by 20 min incubation at 63°C and 2 min at 95°C for DSN inactivation as previously described (6).

## RESULTS

**Development of the NAPA assay for simultaneous detection of two *PIK3CA* hotspot mutations :** The NAPA assay is based on the combination of: a) elimination of WT DNA by multiplex NAME-PrO assay, and b) multiplex ARMS-PCR for both *PIK3CA* mutations and c) Melting curve analysis (Figure 1). In this assay we aim to enhance the specificity of ARMS-PCR by including a two-target NAME-PrO step, to digest enzymatically WT DNA from both *PIK3CA* hotspot mutations before DNA amplification. NAME-PRO creates a strand break on both sense and anti-sense WT DNA strands, and removes the ability of wt templates to amplify. Detection of both mutations was performed by melting curve analysis, which was based on the identification of specific peaks for each ARMS-PCR product that indicated the presence of *PIK3CA* mutations in both exons simultaneously as the  $T_m$  of each product was designed to be significantly different (79°C and 83°C for E545K and H1047L respectively).

FIGURE 1

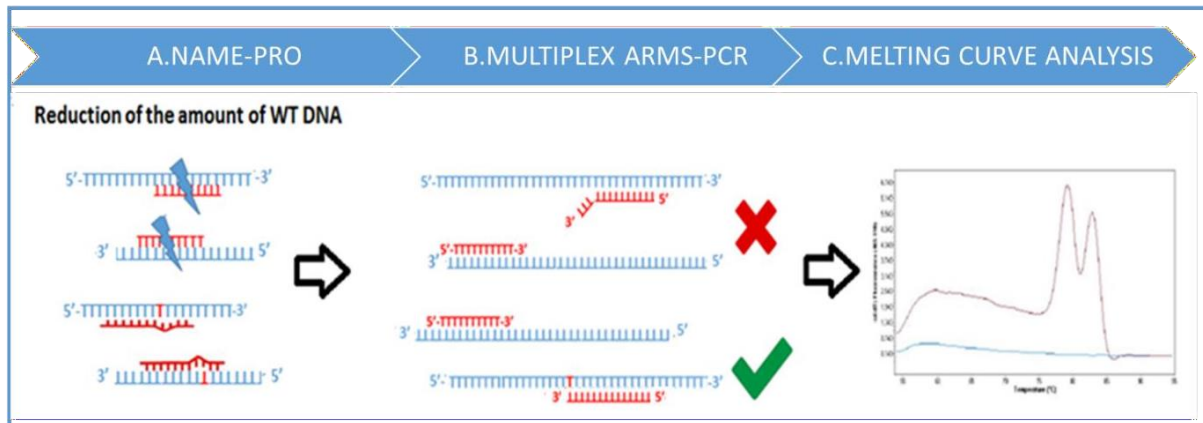


Figure 1. Schematic representation of the experimental procedure of the NAPA assay

**Analytical Sensitivity:** The analytical sensitivity of the NAPA PIK3CA assay was evaluated by mixing known concentrations of mutated gDNA (isolated from cell lines), with WT gDNA at ratios of 50%, 10%, 5%, 1%, 0.5%, 0.1% and 0%. Melting curves were generated and the ability to discriminate melting transitions of the cell line dilutions from that of WT sample was assessed. For PIK3CA exon 9 (E545K), we could clearly discriminate a mutant allelic frequency of 0.5% (MCF-7 DNA), whereas for PIK3CA exon 20 (H1047R), a mutant allelic frequency of 0.1% (T47D DNA) was detectable (Figure 2).

**Analytical Specificity:** We evaluated the NAPA PIK3CA assay specificity by analyzing gDNA isolated from 10 EPCAM+ CTC fraction of healthy female volunteers and from 10 plasma ctDNA of healthy female volunteers. It is important to mention that false positive detection was observed in all cases of healthy female volunteer samples if we did not perform NAME-Pro assay prior to

FIGURE 2

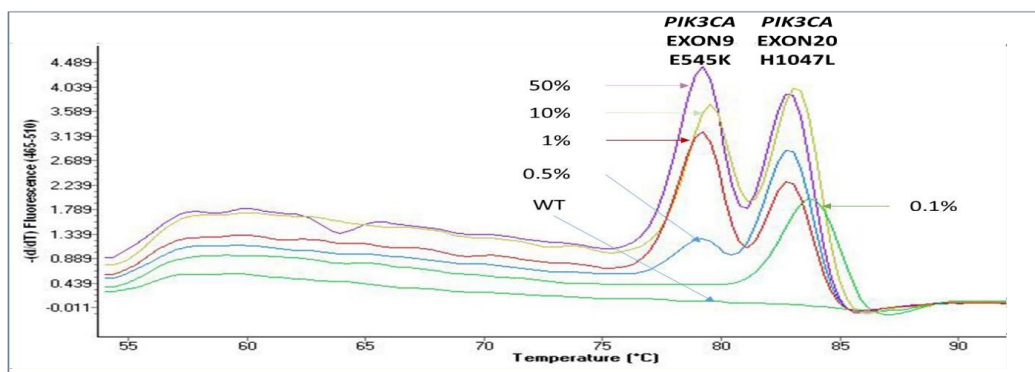
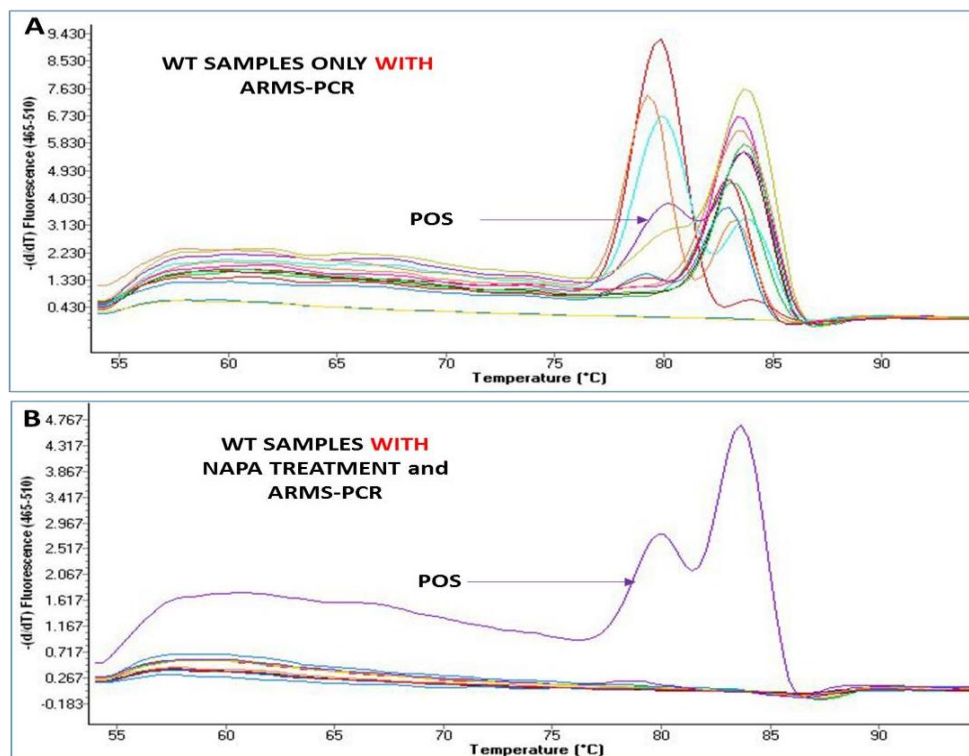


Figure 2. Analytical sensitivity of the NAPA assay in samples prepared by mixing known concentrations of mutated gDNA (isolated from cell lines), with WT gDNA at ratios of 50%, 10%, 5%, 1%, 0.5%, 0.1% and 0%.

ARMS (Figure 3A). This observation could be explained by the fact that even by using the *PIK3CA* hotspot mutation-specific primers, a low amount of the wild-type sequence that is present at very high concentrations could be nonspecifically amplified.

On the contrary, the developed methodology is highly specific, as we did not detect these *PIK3CA* mutations in any of these same samples and we did not detect false positive signals when NAME-PrO assay was performed prior to ARMS (Figure 3B).

**FIGURE 3**



**Figure 3.** Analytical specificity of the NAPA assay by analyzing gDNA isolated from healthy female volunteers **A)** Without NAME-PrO assay treatment prior to ARMS-PCR, **B)** With NAME- PrO assay treatment prior to ARMS-PCR

**Detection of *PIK3CA* mutations in peripheral blood of breast cancer patients by using the NAPA *PIK3CA* assay:**

EpCAM-positive CTC fraction. We applied the developed NAPA *PIK3CA* assay to analyze 24 peripheral blood samples from patients with clinically confirmed metastasis for both hotspot *PIK3CA* mutations. We detected, in total, *PIK3CA* mutations in 4/24(16.7%) patients with metastatic breast cancer, 2/24(8.3%) in exon 9 and 2/24(8.3%) in exon 20. No- treatment control samples were also run in parallel throughout the process, by omitting NaME- PrO to ensure the importance of this assay in ARMS-PCR. If the NAME-PrO step was not included, false positive signals were detected in most these samples (20/24).

**Plasma-ctDNA:** We further applied the developed NAPA *PIK3CA* assay to analyze 17 plasma- ctDNA samples from breast cancer patients with clinically confirmed metastasis. We detected in total, *PIK3CA* mutations in 10/17(58.8%) patients with metastatic breast cancer, 6/17(35.3%) in exon 9 and 4/17(23.5%) in exon 20. All healthy donor samples were negative 0/10 (0%). However, when healthy control samples were also run in parallel throughout the process, by omitting NaME- PrO step, false positive signals were detected in all samples 10/10 (100%).

**Comparison study between NAPA *PIK3CA* assay and ddPCR for the detection of E545K *PIK3CA* hotspot mutation:** The developed NAPA assay gave comparable results with ddPCR ( $p=0.001$ ) (Table 1). More specifically, we analyzed for the presence of *PIK3CA* E545K mutation by ddPCR 41 samples of breast cancer patients with verified metastasis: 24 genomic DNA isolated from EpCAM-positive CTC fraction and 17 plasma-ctDNA samples. Moreover, 20 samples from healthy volunteers were also analyzed in order to define the cut-off of the droplets. In total, the concordance between the novel NAPA *PIK3CA* assay and ddPCR for *PIK3CA* E545K hotspot mutation was 37/41 (90.2%) (Table 1). More specifically, 30 samples were found negative by both assays, 7 samples were found positive by the developed NAPA assay. There were only two samples found positive by the developed NAPA assay and negative by ddPCR, while two samples were found positive by ddPCR and negative NAPA.

## DISCUSSION

While alternative mutation enrichment methods like COLD-PCR (22, 23) can also be used to enrich mutation-containing alleles prior to performing ARMS, a concern is that polymerase errors can occur during the initial COLD-PCR step, thus introducing false positives. Accordingly, to improve the analytical specificity of ARMS-PCR assays here we applied a new approach, NAPA: NaME-PrO-assisted ARMS where wt alleles are removed enzymatically at the genomic DNA level, prior to amplification. Enzymatic approaches using restriction endonucleases to improve ARMS have been reported. NAPA enables enzymatic removal of wt alleles at all sequence positions, hence comprises a generalized approach to improve ARMS. The assay design overcomes the known ARMS defect by adding a brief enzymatic step just prior to ARMS. Restriction enzymes specifically digest wild-type alleles, leaving the mutant alleles available for analysis and overcome false positive signals. Development of multiplex ARMS tests is more complex than for single tests, but once optimized the use of these tests is straightforward and their performance is reliable (24,25).

**Table 1.** Direct comparison between the developed NAPA assay and ddPCR for detecting *PIK3CA* E545K hotspot mutation

		ddPCR		
<b>NAPA <i>PIK3CA</i> assay</b>	EpCAM-positive CTC fraction			
		+	-	Total
	+	2	0	2
	-	2	20	22
	Total	4	20	24
	Concordance: (22/24) 91.7% (p=0.022 chi-square test)			
	cfDNA			
	+	5	2	7
	-	0	10	10
	Total	5	12	17
	Concordance: (15/17) 88.2% (p=0.003, chi-square test)			

We performed this technology for the simultaneous detection of two hot-spot *PIK3CA* mutations (E545K and H1047R) in liquid biopsy samples, CTCs and cfDNA. The developed protocol could simultaneously detect 0.5% of mutated dsDNA for *PIK3CA* exon 9 (E545K) and 0.1% of mutated dsDNA for *PIK3CA* exon 20 (H1047R), and was highly specific. When we performed our developed NAPA assay in clinical samples of metastatic breast cancer patients, we detected *PIK3CA* mutations in 16.7% of EpCAM positive CTC-fraction and in 58.8% in ctDNA. The comparison of our developed assay with ddPCR and our previous ultrasensitive assay which was based on the combination of allele-specific, asymmetric rapid PCR and melting analysis assay gave comparable results with both these assays (p=0.001).

Although, ddPCR is an emerging technology to detect a low abundance of plasma ctDNA with ultra-sensitivity and absolute quantification, in many cases ddPCR instruments are not available, hence NAPA provides a simple, low cost solution for clinically relevant mutations. Not only instrumentation, but the cost of reagents and consumables in the NAPA approach is much lower than ddPCR, while it is also faster to perform. In addition, the high multiplexity afforded by NAME-PRO combines well with multiplexed ARMS. On the contrary, for multiplex application ddPCR requires multi-color instruments, otherwise each mutation should be analyzed in a separate reaction, increasing not only the cost but mainly the precious and usually limited available material in liquid biopsy samples.



## REFERENCES

1. Lianidou E, Pantel K. Liquid biopsies. *Genes Chromosomes Cancer* **2019**;58:219-232.
2. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med.* **2014** ;6:224ra24.
3. Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2005**;102:16368-73.
4. Thierry AR, Moulriere F, El Messaoudi S, Mollevi C, Lopez-Crapez E, et al. Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nat Med.* **2014** ;20:430- 5.
5. Milbury CA, Li J, Makrigiorgos GM. PCR-based methods for the enrichment of minority alleles and mutations. *Clin Chem.* **2009**;55:632-40.
6. Bando H, Yoshino T, Tsuchihara K, Ogasawara N, Fuse N, Kojima T, et al. KRAS mutations detected by the amplification refractory mutation system-Scorpion assays strongly correlate with therapeutic effect of cetuximab. *Br J Cancer.* **2011**;105:403-6.
7. Song C, Liu Y, Fontana R, Makrigiorgos A, Mamon H, Kulke MH, Makrigiorgos GM. Elimination of unaltered DNA in mixed clinical samples via nuclease-assisted minor-allele enrichment. *Nucleic Acids Res.* **2016**;44:e146.
8. Cizkova M, Susini A, Vacher S, Cizeron-Clairac G, Andrieu C, et al. PIK3CA mutation impact on survival in breast cancer patients and in ER $\alpha$ , PR and ERBB2-based subgroups. *Breast Cancer Res.* **2012**; 14:R28.
9. Martini M, Cirao E, Gulluni F, Hirsch E. Targeting PI3K in Cancer: Any Good News? *Front Oncol.* 2013; 3:108.
10. Andersen JN, Sathyanarayanan S, Di Bacco A, Chi A, Zhang T, et al. Pathway-based identification of biomarkers for targeted therapeutics: personalized oncology with PI3K pathway inhibitors. *Sci Transl Med.* **2010**; 2:43ra55.
11. Barbareschi M, Buttitta F, Felicioni L, Cotrupi S, Barassi F, et al. Different prognostic roles of mutations in the helical and kinase domains of the PIK3CA gene in breast carcinomas. *Clin Cancer Res.* **2007**; 13:6064-9.
12. Campbell IG, Russell SE, Choong DY, Montgomery KG, Ciavarella ML et al. Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer Res.* **2004**; 64:7678-81.
13. Markou A, Farkona S, Schiza C, Efstathiou T, Kounelis S, et al. PIK3CA mutational status in circulating tumor cells can change during disease recurrence or progression in patients with breast cancer. *Clin Cancer Res.* **2014**; 20:5823-34.
14. Bingham C, Fernandez SV, Fittipaldi P, Dempsey PW, Ruth KJ, et al. Mutational studies on single circulating tumor cells isolated from the blood of inflammatory breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* **2017**; 163:219-230.
15. Schneck H, Blassl C, Meier-Stiegen F, Neves RP, Janni W, et al. Analysing the mutational status of PIK3CA in circulating tumor cells from metastatic breast cancer patients. *Mol Oncol.* **2013**; 7:976-86.
16. Gasch C, Oldopp T, Mauermann O, Gorges TM, Andreas A, et al. Frequent detection of PIK3CA mutations in single circulating tumor cells of patients suffering from HER2-negative metastatic breast cancer. *Mol Oncol.* **2016**; 10:1330-43.
17. Moynahan ME, Chen D, He W, Sung P, Samoila A, et al. Correlation between PIK3CA mutations in cell-free DNA and everolimus efficacy in HR(+), HER2(-) advanced breast cancer: results from BOLERO-2. *Br J Cancer.* **2017**; 16:726-730.
18. Takeshita T, Yamamoto Y, Yamamoto-Ibusuki M, Tomiguchi M, Sueta A, et al. Clinical significance of plasma cell-free DNA mutations in PIK3CA, AKT1, and ESR1 gene according to treatment lines in ER-positive breast cancer. *Mol Cancer.* **2018**; 17:67.
19. Strati A, Markou A, Parisi C, Politaki E, Mavroudis D, Georgoulas V, Lianidou E. Gene expression profile of circulating tumor cells in breast cancer by RT-qPCR. *BMC Cancer.* **2011**; 11:422. Chimonidou M, Strati A, Tzitzira A, Sotiropoulou G, Malamos N, Georgoulas V, et al. DNA methylation of tumor suppressor and metastasis suppressor genes in circulating tumor cells. *Clin Chem* **2011**; 57:1169–1177
20. Mastoraki S, Strati A, Tzanikou E, Chimonidou M, Politaki E, et al. ESR1 Methylation: A Liquid Biopsy-Based Epigenetic Assay for the Follow-up of Patients with Metastatic Breast Cancer Receiving Endocrine Treatment. *Clin Cancer Res.* **2018**;24:1500-1510.
21. Li J, Wang L, Mamon H, Kulke MH, Berbeco R, Makrigiorgos GM. Replacing PCR with COLD- PCR enriches variant DNA sequences and redefines the sensitivity of genetic testing. *Nat Med.* **2008**;14:579-84.
22. Galbiati S, Brisci A, Lalatta F, Seia M, Makrigiorgos GM, Ferrari M, Cremonesi L. Full COLD- PCR protocol for noninvasive prenatal diagnosis of genetic diseases. *Clin Chem.* **2011**;57:136-8.
23. Ferrie R.M., Schwarz M.J., Robertson N.H., Vaudin S., Super M., et al. Development, multiplexing and application of ARMS tests for common mutations in the CFTR gene. *Am. J. Hum. Genet.* **1992**;51:251-262.
24. Fortina, P, Conant R, Monokian, G., Dotti, G., Parrella, T., et al. Nonradioactive detection of the most common mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene by multiplex allele specific polymerase chain reaction. *Hum. Genet.* **1992**;90:375-378.

## Διαχείριση Υγρών Επικίνδυνων Αποβλήτων Υγειονομικών Μονάδων

Δρ. Μαρία Βλάχου, Χημικός Μηχανικός, Υπεύθυνη Διαχείρισης Αποβλήτων STERIMEDA.E.

### Εισαγωγή

Το Φεβρουάριο του 2018 δημοσιεύτηκε από το Υπουργείο Υγείας η Εγκύκλιος Δ1ε/Γ.Π. 33942/17, που αφορά στη διαχείριση υγρών αποβλήτων υγειονομικών μονάδων. Τα μέτρα και όροι για τη διαχείριση αποβλήτων υγειονομικών μονάδων καθώς και οι γενικές κατευθυντήριες οδηγίες για την κατηγοριοποίησή τους περιγράφονται στην κοινή υπουργική απόφαση (ΚΥΑ)146163/12 και την Εγκύκλιο του Υπουργείου Περιβάλλοντος και Ενέργειας (ΥΠΕΝ) οικ. 29960/3800/15-6-2012. Η νέα Εγκύκλιος στοχεύει στην ορθή και ομοιόμορφη εφαρμογή της ισχύουσας νομοθεσίας, λαμβάνοντας υπόψη το με αρ. πρωτ. 4645/309/1-3-2016 έγγραφο του ΥΠΕΝ, με θέμα «Διαχείριση υγρών αποβλήτων του νοσοκομείου» και αναφέρεται γενικά και ειδικά σε όλα τα είδη υγρών αποβλήτων, που παράγονται από υγειονομικές μονάδες. Στα πλαίσια του σκοπού ενδιαφέροντος του παρόντος άρθρου θα αναπτυχθούν οι ορθές πρακτικές διαχωρισμού και διαχείρισης μόνο των υγρών επικίνδυνων αποβλήτων.

### 1. Υγρά Επικίνδυνα Απόβλητα

Σύμφωνα με την ΚΥΑ 146163/12 τα απόβλητα υγειονομικών μονάδων, είτε είναι στερεά, είτε υγρά διακρίνονται στις παρακάτω κατηγορίες:

#### α. Αστικά Λύματα

#### β. Επικίνδυνα Απόβλητα

- Επικίνδυνα Απόβλητα Αμιγώς Μολυσματικά (ΕΑΑΜ)
- Μικτά Επικίνδυνα Απόβλητα (ΜΕΑ)
- Άλλα Επικίνδυνα Απόβλητα (ΑΕΑ)

#### γ. Ειδικά Ρεύματα Αποβλήτων

Σε όλες τις ανωτέρω κατηγορίες περιλαμβάνονται τόσο στερεά όσο και υγρά απόβλητα, τα οποία ανάλογα με τις ιδιότητές τους (Πίνακας 1) κατατάσσονται στις αντίστοιχες περιπτώσεις επικινδυνότητας. Σύμφωνα με την κείμενη νομοθεσία (ΚΥΑ 146163/2012, Ευρωπαϊκές Συμφωνίες και Κώδικες ADR (Accord européen relatif au transport international des marchandises Dangereuses par Route), IMO/IMDG (International Maritime Organization/International Maritime Dangerous Goods), RID (Règlement International concernant le transport des marchandises dangereuses par chemin de fer), IATA (International Air Transport Association), ICAO(International Civil Aviation Organization), όλα τα επικίνδυνα απόβλητα πρέπει να συσκευάζονται με ασφάλεια και ξεχωριστά σε διακριτούς περιέκτες, ανάλογα με την κατηγορία τους (ΕΑΑΜ, ΜΕΑ, ΑΕΑ). Προϋπόθεση της ασφαλούς συσκευασίας αποτελεί η ταξινόμηση των αποβλήτων, ως προς την επικινδυνότητά τους, σε κλάση και αριθμό UN. Οι αριθμοί UN (UN0001 - UN3600) καθορίστηκαν από την αρμόδια επιτροπή του ΟΗΕ: United Nations Committee of Experts on the Transport of Dangerous Goods).

Οι συσκευασίες πρέπει να φέρουν κατάλληλη σήμανση για την εύκολη αναγνώριση της επικινδυνότητάς τους (Σχήμα 1). Ειδικότερα, η χωριστή συλλογή υγρών αποβλήτων πρέπει να γίνεται σε πιστοποιημένους περιέκτες (μπιτόνια) κατάλληλου υλικού (πλην πολυβινυλοχλωρίδιου PVC), που να είναι ανθεκτικό στη διάβρωση (Σχήμα 2) και στις μηχανικές καταπονήσεις, χωρητικότητας κατά προτίμηση 10–30 lit. Η πλήρωση των περιεκτών αυτών δεν θα πρέπει να ξεπερνά τα  $\frac{3}{4}$  του συνολικού τους όγκου, ενώ απαγορεύεται η διαδικασία απόρριψης του περιεχομένου και επαναλαμβανόμενης πλήρωσης του υποδοχέα.

Πίνακας 1: Ιδιότητες Επικίνδυνων Αποβλήτων (Παράρτημα III, Ν. 4042/2012)

Κατηγορία επικινδυνότητας (H: hazard)	Χαρακτηρισμός κινδύνου
H1	Εκρηκτικό
H2	Οξειδωτικό
H3 A	Πολύ εύφλεκτο
H3B	Εύφλεκτο
H4	Ερεθιστικό
H5	Επιβλαβές
H6	Τοξικό
H7	Καρκινογόνο
H8	Διαβρωτικό
H9	Μολυσματικό
H 10	Τοξικό για την αναπαραγωγή
H11	Μεταλλαξογόνο
H12	Απόβλητα που εκλύουν τοξικό ή πολύ τοξικό αέριο
H13	Ευαισθητοποιητικό
H14	Οικοτοξικό
H15	Απόβλητα ικανά μετά από διάθεση, να δημιουργήσουν, με οποιοδήποτε μέσο, άλλη ουσία

Διαχείριση: ..... τηλ .....	
<b>UN</b> .....	
<b>EKA</b> .....	
Κλάση .....	
<b>ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ</b>	
<b>ΠΡΟΣ</b> .....	
Ημερομηνία Παραγωγής: .....	Παραγωγός Αποβλήτων (ΥΜ): .....
Θέση – Χώρος Παραγωγής: .....	Κατηγορία ΕΑΥΜ: <input type="checkbox"/> ΕΑΑΜ <input type="checkbox"/> ΜΕΑ <input type="checkbox"/> ΑΕΑ
Προορισμός: .....	.....

Σχήμα 1: Ενδεικτική φωτογραφία σήμανσης συσκευασιών επικίνδυνων αποβλήτων.  
 ΥΜ: Υγειονομική Μονάδα, ΕΚΑ: Ευρωπαϊκός Κατάλογος Αποβλήτων (6-ψήφιοι κωδικοί)  
 (Παράδειγμα UN: 1992, Κωδικός ΕΚΑ: 16 05 06, Κλάση: 3 Εύφλεκτο)

### 1.1. Αστικά Λύματα

Ως **αστικά λύματα** χαρακτηρίζονται τα μη στερεά απόβλητα που προέρχονται από τα σπίτια και την εμπορική δραστηριότητα του αστικού ιστού (καθαριότητα ανθρώπων και κτηρίων, οικιακές δραστηριότητες, δραστηριότητες σε καταστήματα και γραφεία, εργασίες συντήρησης των εγκαταστάσεων και των κτιριακών υποδομών). Στα αστικά υγρά λύματα περιλαμβάνονται, μεταξύ άλλων, κάποια είδη τα οποία χρήζουν διαχωρισμού και χωριστής διάθεσης σε κατάλληλα αδειοδοτημένους φορείς. Αυτά είναι:

- Από τα μαγειρεία: τα λίπη και έλαια
- Από τις οδοντιατρικές καρέκλες: το αμάλαμα υδραργύρου
- Από τους αναλυτές αίματος (π.χ βιοχημικούς, αιματολογικούς): τα υγρά απόβλητα.



Σχήμα 2: Ενδεικτικές φωτογραφίες από πιστοποιημένους περιέκτες συλλογής υγρών αποβλήτων.

### 1.2. Επικίνδυνα Απόβλητα Αμιγώς Μολυσματικά (EAAM)

Τα υγρά EAAM περιλαμβάνουν απόβλητα από αναλυτές ορού και πλήρους ολικού αίματος, υγρά παροχετεύσεων και παρακεντήσεων κλπ. και η ενδεδειγμένη μέθοδος επεξεργασίας τους είναι η **αποστείρωση**. Σημειώνεται ότι τα υγρά EAAM δύνανται να αποβάλλονται στο σύστημα αποχέτευσης μόνο μετά από κατάλληλη εξουδετέρωση ή/και προεπεξεργασία, έπειτα από ανάμιξη με υποκατάστατα υποχλωριώδους νατρίου (ή άλλων κατάλληλων ουσιών) και παρακολούθηση των ποιοτικών τους χαρακτηριστικών (μικροβιακό φορτίο, pH, COD, αιωρούμενα στερεά, κλπ.) με τεκμηριωμένες αναλύσεις και δοκιμές, και πάντα σύμφωνα με τις απαιτήσεις του φορέα παρακολούθησης του δικτύου αποχέτευσης. Ως COD (Chemical Oxygen Demand – ΧΑΟ: Χημικά Απαιτούμενο Οξυγόνο) ορίζεται η ποσότητα οξυγόνου που απαιτείται για την πλήρη χημική οξείδωση του συνόλου των οργανικών ενώσεων που περιέχονται σε ένα δείγμα.

### 1.3. Μικτά Επικίνδυνα Απόβλητα (ΜΕΑ)

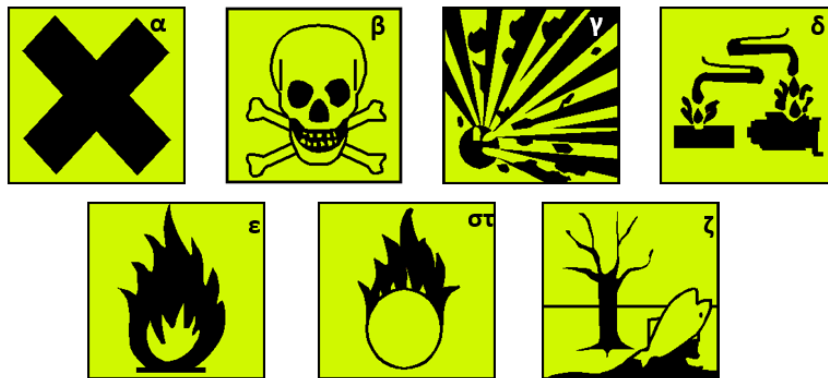
Τα υγρά ΜΕΑ περιλαμβάνουν υγρά απόβλητα από βιοχημικές εξετάσεις, χημειοθεραπείες, παθολογοανατομικά εργαστήρια και η ενδεδειγμένη μέθοδος επεξεργασίας τους είναι η **αποτέφρωση**.

#### 1.4. Άλλα Επικίνδυνα Απόβλητα (ΑΕΑ)

Τα υγρά ΑΕΑ περιλαμβάνουν όλα τα χημικά αντιδραστήρια/ διαλύτες, που χρησιμοποιούνται στα διάφορα τμήματα και εργαστήρια των υγειονομικών μονάδων και μπορούν να διακριθούν στα παρακάτω:

- Ακτινολογικά υγρά που προέρχονται από τα ακτινογραφικά μηχανήματα. Οι ενδεδειγμένες μέθοδοι διαχείρισής τους είναι η αναγέννηση των διαλυτών ή η ανάκτηση αργύρου ή η ανακύκλωση ή η αποτέφρωση.
- Διαλύτες, χρωστικές και άλλες χημικές ουσίες, που προέρχονται από παθολογοανατομικά/διαγνωστικά εργαστήρια. Οι ενδεδειγμένες μέθοδοι διαχείρισής τους είναι η ανάκτηση ή η αποτέφρωση.
- Απόβλητα που περιέχουν υδράργυρο και προέρχονται από θερμομέτρα, πιεσόμετρα ή άλλες συσκευές. Η ενδεδειγμένη μέθοδος διαχείρισής τους είναι η ανάκτηση.

Όλες οι συσκευασίες των υγρών ΑΕΑ που χρησιμοποιούνται στα διάφορα τμήματα των υγειονομικών μονάδων φέρουν τις ανάλογες ετικέτες κινδύνου, όπως ενδεικτικά παρουσιάζονται στο Σχήμα 3. Πρόσθετα στοιχεία σχετικά με τη διαχείριση του κάθε υλικού διατίθενται στα Δελτία Δεδομένων Ασφαλείας (Material Safety Data Sheet, MSDS).



Σχήμα 3: Ετικέτες κινδύνου (α) ερεθιστικό, (β) τοξικό, (γ) εκρηκτικό, (δ) διαβρωτικό, (ε) εύφλεκτο, (στ) οξειδωτικό, (ζ) επιβλαβές για το περιβάλλον.

#### 1.5. Ειδικά Ρεύματα Αποβλήτων

Τα ειδικά ρεύματα αποβλήτων αποτελούν κυρίως στερεά απόβλητα, όπως μπαταρίες, απόβλητα ηλεκτρικού και ηλεκτρονικού εξοπλισμού (ΑΗΗΕ), συσκευασίες με αέρια υπό πίεση, αλλά και υγρά, όπως ραδιενεργά ή διαλύματα που περιέχουν βαρέα μέταλλα.

- Τα ραδιενεργά απόβλητα πρέπει να συλλέγονται χωριστά, να αποθηκεύονται και να υπόκεινται σε περαιτέρω διαχείριση σύμφωνα με τις οδηγίες της Ελληνικής Επιτροπής Ατομικής Ενέργειας (ΕΕΑΕ) υπό την επίβλεψη του Διευθυντή του Ακτινολογικού Τμήματος για την ασφαλή αποσύνθεσή τους, σύμφωνα με τις απαιτήσεις της Απόφασης 1014/ΦΟΡ/94 (ΦΕΚ 216/Β/2001).
- Τα απόβλητα που περιέχουν υψηλό ποσοστό βαρέων μετάλλων (π.χ. κάδμιο, υδράργυρος κλπ) θα πρέπει να συλλέγονται χωριστά σε ανθεκτικά και στεγανά δοχεία με σήμανση, που να πληροφορεί για το περιεχόμενό τους.

Λαμβάνοντας υπόψη τα ανωτέρω, γίνεται αντιληπτό ότι η νομοθεσία προβλέπει μια γενική κατηγοριοποίηση των επικίνδυνων αποβλήτων των υγειονομικών μονάδων βάσει της επικινδυνότητας και των χαρακτηριστικών τους. Ο Πίνακας 2 που ακολουθεί, παρουσιάζει συγκεντρωτικά όλες τις παραπάνω περιπτώσεις, ανά είδος, με τους αντίστοιχους αριθμούς ΕΚΑ, Η και UN, αλλά και την ενδεδειγμένη μέθοδο διαχείρισης, παραθέτοντας παράλληλα και ενδεικτικά παραδείγματα ουσιών για κάθε κατηγορία ΕΑΥΜ.

Πίνακας 2: Κατηγοριοποίηση Υγρών ΕΑΥΜ ανά αριθμό ΕΚΑ και UN

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΕΑΥΜ (κίνδυνος)	ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ	ΕΚΑ	ΚΛΑΣΗ	Η	UN	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ (παραδείγματα)
ΕΑΑΜ (H9)	ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ	180103*	6.2	6.2	3291	ΚΛΙΝΙΚΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ, ΜΗ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΕΝΑ Ε.Α.Ο.	ΑΙΜΑ,ΥΓΡΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΑΠΟ ΑΝΑΛΥΤΕΣ, ΟΥΡΑ
ΜΕΑ (H6, H9)	ΑΠΟΤΕΦΡΩΣΗ	180103*	6.2	6.1 & 6.2	3291	ΚΛΙΝΙΚΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ, ΜΗ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΕΝΑ Ε.Α.Ο.	ΥΓΡΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑΣ
ΛΕΑ (H2, H3B, H6, H8)	ΑΠΟΤΕΦΡΩΣΗ	180108*	6.1	6.1	1851	ΦΑΡΜΑΚΑ ΥΓΡΑ, ΤΟΞΙΚΑ, Ε.Α.Ο.	ΥΓΡΑ ΦΑΡΜΑΚΑ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑΣ - ΚΥΤΤΑΡΟΣΤΑΤΙΚΑ - ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΑ
		180106*	6.1	6.1	1851	ΦΑΡΜΑΚΑ ΥΓΡΑ, ΤΟΞΙΚΑ, Ε.Α.Ο.	ΥΓΡΑ ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΑ ΦΑΡΜΑΚΑ
		180109	6.1	6.1	1851	ΦΑΡΜΑΚΑ ΥΓΡΑ, ΤΟΞΙΚΑ, Ε.Α.Ο.	ΥΓΡΑ ΜΗ-ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΑ ΦΑΡΜΑΚΑ
		180106*	6.1	6.1	2810	ΤΟΞΙΚΑ ΥΓΡΑ, ΟΡΓΑΝΙΚΑ, Ε.Α.Ο.	ΥΓΡΕΣ ΟΡΓΑΝΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ, ΚΑΘΑΡΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ή ΤΑ ΜΙΓΜΑΤΑ ΤΟΥΣ (Φορμόλη, Ξυλόλιο, Χλωροφόρμιο, Χρώσεις, Αιματοξυλίνη, Ηωσίνη, Διχλωρομεθάνιο, Χλωροφόρμιο, Αλκάνια, Πολυακρυλαμίδιο, Τριχλωροαιθυλένιο, Biocal:Φωτοπολυμεριζόμενο υδροξειδίο ασβεστίου σε πάστα – οδοντιατρικό υλικό
		180106*	6.1	6.1	3287	ΤΟΞΙΚΑ ΥΓΡΑ, ΑΝΟΡΓΑΝΑ, Ε.Α.Ο.	ΥΓΡΕΣ ΑΝΟΡΓΑΝΕΣ ΟΥΣΙΕΣ, ΚΑΘΑΡΕΣ ΟΥΣΙΕΣ Η ΤΑ ΜΙΓΜΑΤΑ ΤΟΥΣ (Άλατα αμμωνίου, εναμμώνιο νιτρικό δημήτριο, χλωριούχο λίθιο)
		180106*	6.1	6.1 & 8	3289	ΤΟΞΙΚΑ ΥΓΡΑ, ΔΙΑΒΡΩΤΙΚΑ, ΑΝΟΡΓΑΝΑ, Ε.Α.Ο.	ΥΓΡΕΣ ΑΝΟΡΓΑΝΕΣ ΟΥΣΙΕΣ, ΔΙΑΒΡΩΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΚΑΘΑΡΕΣ ΟΥΣΙΕΣ Η ΤΑ ΜΙΓΜΑΤΑ ΤΟΥΣ (Θειικό οξύ, Υδροχλωρικό οξύ, Υδροξειδίο του νατρίου, Νιτρικό οξύ, Χρωμικό οξύ, Διάλυμα αμμωνίας, Bone Decalcifiers, Χλωριούχος σίδηρος)
		180106*	6.1	6.1 & 8	2927	ΤΟΞΙΚΑ ΥΓΡΑ, ΔΙΑΒΡΩΤΙΚΑ, ΟΡΓΑΝΙΚΑ, Ε.Α.Ο.	ΥΓΡΕΣ ΟΡΓΑΝΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ, ΔΙΑΒΡΩΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ, ΚΑΘΑΡΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ, Η ΤΑ ΜΙΓΜΑΤΑ ΤΟΥΣ (Φαινόλη, Τριφθοροξείκο οξύ, Οξείκο οξύ, Μερκαπτο-αιθανόλη, RNAzol για την απομόνωση του RNA, Tetramethyl-ethylene-diamine – TMEDA – TEMED)
		180106*	6.1	6.1 & 5.1	3122	ΤΟΞΙΚΑ ΥΓΡΑ, ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ, Ε.Α.Ο.	ΥΓΡΕΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ, ΚΑΘΑΡΕΣ ΟΥΣΙΕΣ Η ΤΑ ΜΙΓΜΑΤΑ ΤΟΥΣ (Υπερθεϊκό αμμώνιο, Υπερμαγγανικό κάλιο, Διχρωμικό κάλιο)
		180106*	6.1	6.1 & 3	2929	ΤΟΞΙΚΑ ΥΓΡΑ, ΕΥΦΛΕΚΤΑ, ΟΡΓΑΝΙΚΑ, Ε.Α.Ο.	ΥΓΡΕΣ ΟΡΓΑΝΙΚΕΣ ΕΥΦΛΕΚΤΕΣ ΟΥΣΙΕΣ, ΚΑΘΑΡΕΣ ΟΥΣΙΕΣ Η ΤΑ ΜΙΓΜΑΤΑ ΤΟΥΣ (Αιθανόλη, Ακετόνη, Μεθανόλη, Εξάνιο, Ισοαμυλική αλκοόλη, Διαιθυλαιθέρας, Προπανόλη, Ακετονιτρίλιο, Serphasyl ρητίνες για στήλες χρωματογραφίας, Παραφίνη, Μυρμηκικό οξύ).

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΕΑΥΜ (κίνδυνος)	ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ	ΕΚΑ	ΚΛΑΣΗ	H	UN	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ (παραδείγματα)
		180106*	6.1	6.1	3142	ΤΟΞΙΚΑ, ΥΓΡΑ, ΑΠΟΛΥΜΑΝΤΙΚΑ Ε.Α.Ο.	ΥΓΡΑ ΑΠΟΛΥΜΑΝΤΙΚΑ, ΚΑΘΑΡΕΣ ΟΥΣΙΕΣ Η ΤΑ ΜΙΓΜΑΤΑ ΤΟΥΣ (Φορμαλδεΐδη, γλουταραλδεΐδη, Απολυμαντικά διαλύματα χειρουργικών εργαλείων πχ. Cidex, Korsolex, Steranios, Sekusept, Bodedex)
ΑΕΑ (H6)	ΑΝΑΚΤΗΣΗ	09 01 03*	6.1	6.1	3287	ΤΟΞΙΚΑ ΥΓΡΑ, ΑΝΟΡΓΑΝΑ, Ε.Α.Ο.	ΑΚΤΙΝΟΛΟΓΙΚΑ ΥΓΡΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ / ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΕΜΦΑΝΙΣΤΗΡΙΟΥ ΜΕ ΒΑΣΗ ΔΙΑΛΥΤΕΣ
		09 01 04*	6.1	6.1	3287	ΤΟΞΙΚΑ ΥΓΡΑ, ΑΝΟΡΓΑΝΑ, Ε.Α.Ο.	ΑΚΤΙΝΟΛΟΓΙΚΑ ΥΓΡΑ ΣΤΕΡΕΩΣΗΣ/ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΤΗ
		09 01 05*	6.1	6.1	3287	ΤΟΞΙΚΑ ΥΓΡΑ, ΑΝΟΡΓΑΝΑ, Ε.Α.Ο.	ΑΚΤΙΝΟΛΟΓΙΚΑ ΥΓΡΑ - ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΞΕΠΛΥΜΑΤΟΣ & ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΞΕΠΛΥΜΑΤΟΣ ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΤΗ
		09 01 06*	6.1	6.1	3287	ΤΟΞΙΚΑ ΥΓΡΑ, ΑΝΟΡΓΑΝΑ, Ε.Α.Ο.	ΑΚΤΙΝΟΛΟΓΙΚΑ ΥΓΡΑ - ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΧΟΥΝ ΑΡΓΥΡΟ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΤΟΠΟΥ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΚΤΙΝΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ
		09 01 13*	6.1	6.1	3287	ΤΟΞΙΚΑ ΥΓΡΑ, ΑΝΟΡΓΑΝΑ, Ε.Α.Ο.	ΑΚΤΙΝΟΛΟΓΙΚΑ ΥΓΡΑ - ΥΔΑΤΙΚΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΤΟΠΟΥ ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΑΡΓΥΡΟΥ
ΑΕΑ (H6, H8)	ΑΝΑΚΤΗΣΗ	20 01 21*	8	6.1 & 8	2809	ΥΔΡΑΡΓΥΡΟΣ	ΣΤΟΙΧΕΙΑΚΟΣ ΥΔΡΑΡΓΥΡΟΣ ΠΟΥ ΕΧΕΙ ΣΥΛΛΕΧΘΕΙ ΑΠΟ ΔΙΑΡΡΟΗ
		20 01 21*	8	6.1 & 8	3506	ΥΔΡΑΡΓΥΡΟΣ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΕΤΑΙ ΣΕ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΑ ΕΙΔΗ	ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΠΟΥ ΠΕΡΙΧΟΥΝ ΥΔΡΑΡΓΥΡΟ

*Ε.Α.Ο: Εάν Άλλως Ορίζεται, είναι απόδοση στα ελληνικά του όρου N.O.S: not otherwise specified*

## 2. Ανάμιξη Επικίνδυνων Υγρών Αποβλήτων (ΑΕΑ)

Η νομοθεσία απαγορεύει ρητά την ανάμιξη των διαφορετικών κατηγοριών αποβλήτων (ΕΑΑΜ, ΜΕΑ και ΑΕΑ). Παρ' όλα αυτά επιτρέπεται η ανάμιξη υγρών ΑΕΑ μόνο εφόσον τηρείται η συμβατότητάς τους ως προς την μη αντίδρασή μεταξύ τους. Πρακτικά αυτό σημαίνει ότι ουσίες που ανήκουν στον ίδιο αριθμό ΕΚΑ και UN μπορούν να συλλεχθούν σε κοινό περιέκτη, εφόσον δεν αντιδρούν μεταξύ τους προς παραγωγή επικίνδυνων αερίων ή θερμότητας. Σημαντική παράμετρος σε αυτό το σημείο είναι ο έλεγχος των ιδιοτήτων των ουσιών που πρόκειται να αναμιχθούν. Για παράδειγμα, το χλωροφόρμιο, που χρησιμοποιείται ως κοινός διαλύτης στα εργαστήρια, επειδή είναι σχετικά αδρανές, αναμίξιμο με τους περισσότερους οργανικούς διαλύτες, μη εύφλεκτο και πτητικό. Κατατάσσεται στα ΑΕΑ με αριθμό ΕΚΑ 18 01 06\* και αριθμό UN 2810 ως τοξική υγρή οργανική ουσία. Ωστόσο, επειδή οι ατμοί του είναι επικίνδυνοι για τον άνθρωπο, γιατί καταστέλλουν το κεντρικό νευρικό σύστημα, δε συνιστάται η ανάμιξή του με άλλες χημικές ουσίες (Βαλαβανίδης και Ευσταθίου, 2011).

Γενικές οδηγίες ανάμιξης διαλυτών περιλαμβάνονται στις οδηγίες εκχύλισης από τη διεθνή βιβλιογραφία (Πίνακας αναμιξιμότητας διαλυτών, Solvent Miscibility Table) (Πίνακας 3). Επίσης, στον Πίνακα 4 παρατίθενται οδηγίες περί μη συμβατότητας χημικών ουσιών προς ανάμιξη, επειδή ή η μεταξύ τους αντίδραση είναι ισχυρά εξώθερμη ή στη μεταξύ τους αντίδραση εκλύονται επικίνδυνα αέρια (Consumer Product Safety Commission, 2006).

Πίνακας 3: Αναμιξιμότητα διαλυτών (Stanislaus California State University, 2015)

	οξικό οξύ	ακετόνη	ακετονιτρίλιο	βενζόλιο	n-βουτανόλη	τετραχλωράνθρακας	χλωροφόρμιο	κυκλοεξάνιο	κυκλοπεντάνιο	1,2-δichλωροαιθάνιο	διχλωρομεθάνιο	διμεθυλοφορμαμίδιο	διμεθυλοσουλφοξείδιο	διοξάνιο	αιθανόλη	οξικός αιθυλεστέρας	διαιθυλαιθέρας	φορμικό οξύ	n-επτάνιο	n-εξάνιο	μεθανόλη	μεθυλοαιθυλο κετόνη	ισοοκτάνιο	n-πεντάνιο	2-προπανόλη	δισοπροπυλαιθέρας	τετραχλωροαιθάνιο	τετραϋδροφουράνιο	τολουόλιο	τριχλωροαιθυλένιο	νερό	ξυλόλιο		
οξικό οξύ																																		
ακετόνη																																		
ακετονιτρίλιο																																		
βενζόλιο																																		
n-βουτανόλη																																		
τετραχλωράνθρακας																																		
χλωροφόρμιο																																		
κυκλοεξάνιο																																		
κυκλοπεντάνιο																																		
1,2-δichλωροαιθάνιο																																		
διχλωρομεθάνιο																																		
διμεθυλοφορμαμίδιο																																		
διμεθυλοσουλφοξείδιο																																		
διοξάνιο																																		
αιθανόλη																																		
οξικός αιθυλεστέρας																																		
διαιθυλαιθέρας																																		
φορμικό οξύ																																		
n-επτάνιο																																		
n-εξάνιο																																		
μεθανόλη																																		
μεθυλο-αιθυλο κετόνη																																		
ισοοκτάνιο																																		
n-πεντάνιο																																		
2-προπανόλη																																		
δισοπροπυλαιθέρας																																		
τετραχλωροαιθάνιο																																		
τετραϋδροφουράνιο																																		
τολουόλιο																																		
τριχλωροαιθυλένιο																																		
νερό																																		
ξυλόλιο																																		



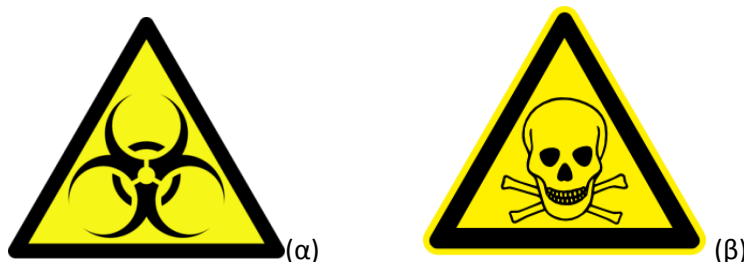
Πίνακας 4: Χημικές ουσίες που αντιδρούν μεταξύ τους (American Chemical Society, 2016)

ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ	ΑΝΤΙΔΡΑ ΜΕ
Ακετόνη	Υπεροξειδίο του υδρογόνου
Αλκάλια (λίθιο, νάτριο, κάλιο)	Διοξειδίο του άνθρακα, νερό, αλκοόλες
Θειικό οξύ	Χλωρικά, υπερχλωρικά, υπερμαγγανικά
Ιώδιο	Αμμωνία
Νιτρικό αμμώνιο	Οξέα, εύφλεκτα υγρά, κονιοποιημένα μέταλλα
Νιτρικό οξύ	Οξικό οξύ, ακετόνη, αλκοόλες, εύφλεκτα οργανικά υγρά
Νιτρώδες νάτριο	Άλατα αμμωνίου
Οξαλικό οξύ	Άργυρος, υδράργυρος
Οξικό οξύ	Νιτρικό οξύ, υπεροξειδία, υπερμαγγανικά
Οξικός ανυδρίτης	Αιθυλενογλυκόλη, υδροξυλιωμένες ουσίες
Υδρογονάνθρακες	Χλώριο, βρώμιο, υπεροξειδία
Υπερμαγγανικό κάλιο	Αιθυλενογλυκόλη, γλυκερόλη, θειικό οξύ
Υπεροξειδίο του υδρογόνου	Χαλκός, σίδηρος, εύφλεκτα υγρά, άλατα μετάλλων
Χλωρικά άλατα	Οξέα, άλατα αμμωνίου, κονιοποιημένα μέταλλα
Χλώριο	Αμμωνία, βουτάνιο, υδρογόνο, τερεβινθέλαιο (νέφτι), ρινίσματα μετάλλων

### 3. Αποθήκευση Υγρών Επικίνδυνων Αποβλήτων

Βάσει της νομοθεσίας, τα διαχωρισμένα και καταλλήλως συσκευασμένα επικίνδυνα απόβλητα (το ίδιο ισχύει για τα στερεά και για τα υγρά) πρέπει να αποθηκεύονται εντός της υγειονομικής μονάδας σε ορισμένο και επαρκή χώρο για την κάθε κατηγορία αποβλήτου ανάλογα με τις παραγόμενες ποσότητες και τη συχνότητα συλλογής τους.

Τα ΕΑΑΜ και τα ΜΕΑ φυλάσσονται σε ψυκτικό θάλαμο, για χρονικό διάστημα όχι μεγαλύτερο των 5 ημερών, σε θερμοκρασία υποχρεωτικά μικρότερη ή ίση με 5°C. Ειδικά για την περίπτωση που οι ποσότητες είναι μικρότερες των 500 λίτρων, η αποθήκευση μπορεί να γίνει μέχρι 30 ημέρες σε θερμοκρασία μικρότερη ή ίση με 0°C. Οι χώροι αποθήκευσης θα πρέπει να φέρουν κατάλληλη και ευκρινή σήμανση με τον όρο «Επικίνδυνα Απόβλητα» και το διεθνές σύμβολο του μολυσματικού χαρακτήρα (Σχήμα 4α) για τα ΕΑΑΜ και πρόσθετα και του τοξικού χαρακτήρα (Σχήμα 4β) για τα ΜΕΑ. Η θερμοκρασία των ψυκτικών θαλάμων ελέγχεται σε τακτά χρονικά διαστήματα και καταγράφεται σε αρχείο. Κάθε φορά, που ο χώρος αποθήκευσης των παραπάνω κατηγοριών αποβλήτων, αδειάζει, καθαρίζεται και απολυμαίνεται σχολαστικά.



Σχήμα 4: α) Διεθνές σήμα μολυσματικού χαρακτήρα και β) Διεθνές σήμα τοξικού χαρακτήρα.

Τα ΑΕΑ δύναται να αποθηκεύονται για χρονικό διάστημα όχι μεγαλύτερο του ενός έτους. Κατά την αποθήκευσή τους οι χρησιμοποιούμενοι χώροι, πρέπει βάσει της νομοθεσίας, να διαμορφώνονται ειδικά για το σκοπό αυτό και να βρίσκονται σε απόσταση ασφαλείας από τους υπόλοιπους λειτουργικούς χώρους και

τους χώρους αποθήκευσης άλλων υλικών της υγειονομικής μονάδας. Επιπλέον, οι χώροι αυτοί πρέπει να είναι τέτοιοι, ώστε να προφυλάσσουν τα αποθηκευμένα απόβλητα από βροχές, πλημμύρες, φωτιά κ.λπ. και να πληρούν τις προδιαγραφές της νομοθεσίας (ευχέρεια πρόσβασης, δάπεδο βιομηχανικού τύπου, κατάλληλης στιλπνότητας και επαρκούς αντιδιαβρωτικής προστασίας).

Η εγκύκλιος, τέλος, τονίζει την σημαντικότητα του ρόλου του Εσωτερικού Κανονισμού Διαχείρισης Αποβλήτων Υγειονομικών Μονάδων στην ορθή διαχείριση των αποβλήτων. Αναπόσπαστο κομμάτι του εσωτερικού κανονισμού πρέπει να είναι τα στοιχεία που τεκμηριώνουν την κατηγοριοποίηση των αποβλήτων σε επικίνδυνα ή μη (νομοθεσία, εγκύκλιοι, Δελτία Δεδομένων Ασφαλείας, Βεβαιώσεις Προμηθεύτριας Εταιρείας, εσωτερική διαδικασία εκτίμησης της ανάγκης προστασίας από μόλυνση κ.α.), και την καταλληλότητα της όποιας επεξεργασίας πραγματοποιείται (πχ απολύμανση, ρύθμιση pH, ανάκτηση διαλυτών κ.λ.π.).

#### 4. Βιβλιογραφία

- *American Chemical Society, 2016, Guidelines for Chemical Laboratory Safety in Secondary Schools, Washington, DC.*
- *Consumer Product Safety Commission, 2006, Department of Health and Human Services, School Chemistry Laboratory Safety Guide. [The National Institute for Occupational Safety and Health \(NIOSH\), https://www.cdc.gov/niosh/docs/2007-107/default.html](https://www.cdc.gov/niosh/docs/2007-107/default.html)*
- *Stanislaus California State University, 2015, Solvent Miscibility Table [https://www.csustan.edu/sites/default/files/groups/Chemistry/Drake/documents/solvent\\_miscibility\\_table.pdf](https://www.csustan.edu/sites/default/files/groups/Chemistry/Drake/documents/solvent_miscibility_table.pdf)*
- *Βαλαβανίδης Θ., Ευσταθίου Κ., 2011, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Χημείας, Η χημική ένωση του μήνα: Χλωροφόρμιο (τριχλωρομεθάνιο), [http://195.134.76.37/chemicals/chem\\_CHCl3.htm](http://195.134.76.37/chemicals/chem_CHCl3.htm)*
- *Εγκύκλιος του ΥΠΕΝ αρ. πρωτ. οικ. 29960/3800/15-6-2012 «Ενδεικτικές κατηγορίες Αποβλήτων Υγειονομικών Μονάδων (ΑΥΜ)/ Ενδεικτικές κατάλληλες εργασίες διαχείρισης ΑΥΜ- Διευκρινίσεις επί ορισμένων απαιτήσεων της ΚΥΑ οικ. 146163/2012» (ΑΔΑ Β4ΛΓ0-Κ75).*
- *ΚΥΑ 146163/2012 (ΦΕΚ 1537/Β/8-5-12) «Μέτρα και όροι για τη διαχείριση αποβλήτων Υγειονομικών Μονάδων», όπως έχει τροποποιηθεί με ΚΥΑ την 62952/538 (ΦΕΚ 4326/Β/30-12-2016).*



## Ρομανώφ: Η συμβολή της DNA ανάλυσης στην επίλυση μυστηρίων, που έχουν ταφεί στην Ιστορία

Διαμάντω Κουνιάκη<sup>1</sup>, Ανδριανή Γρηγοράτου<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Τμήμα Ανοσολογίας Ιστοσυμβατότητας Π. Γ.Ν.Α. “Ο Ευαγγελισμός” και

<sup>2</sup>Τμήμα Βιοχημικό Π.Γ.Ν.Α. “Ο Ευαγγελισμός”

Για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα του 20<sup>ου</sup> αιώνα, η τύχη της τελευταίας αυτοκρατορικής οικογένειας της Ρωσίας, των Ρομανώφ, αποτέλεσε ένα μυστήριο. Ο Νικόλαος Β΄ (1868-1918, τσάρος της Ρωσίας, Βασιλιάς της Πολωνίας και Μεγάλος Δούκας της Φινλανδίας την περίοδο 1894-1917), η σύζυγός του τσαρίνα Alexandra Fyodorovna [(1872-1918), αρχικά Αλίξ της Έσσης και παρά τω Ρήνω, εγγονή της βασίλισσας του Ηνωμένου Βασιλείου Μεγάλης Βρετανίας και Ιρλανδίας και αυτοκράτειρας των Ινδιών Βικτώριας (*Alexandrina Victoria*, 1819-1901)] και τα πέντε παιδιά τους Όλγα, Τατιάνα, Μαρία, Αναστασία και Αλεξί εκτελέστηκαν μετά από μήνες κράτησης στις 17 Ιουλίου 1918 από Μπολσεβίκους στρατιώτες σε σπίτι τοπικού εμπόρου, του Ipatiev στην πόλη Ekaterinburg της κεντρικής Ρωσίας.



**Εικόνα 1.** Η τελευταία αυτοκρατορική οικογένεια της Ρωσίας. Από αριστερά προς τα δεξιά: Όλγα, Μαρία, Τσάρος Νικόλαος Β΄, η σύζυγός του Τσαρίνα Alexandra Fyodorovna, Αναστασία, Αλεξί και Τατιάνα.

Πορτρέτο από το Levitsky Studio, Livadiya, Ukraine.

Σύμφωνα με το ιστορικό έγγραφο "Yurovsky", που συντάχθηκε από τον αρχηγό που ηγείτο του αποσπάσματος, Yakov Yurovsky (Яков Юровский), οι σοροί έπρεπε να μεταφερθούν και να ταφούν σε κοντινό ορυχείο στο δάσος Korotyaki της Σιβηρίας, λίγα μίλια μακριά από το Ekaterinburg, κοντά στην περιοχή Four Brothers. Ωστόσο, στην πορεία το όχημα μεταφοράς εμφάνισε μηχανικό πρόβλημα. Ένας ρηχός τάφος σκάβεται βιαστικά στην άκρη του δρόμου, ενώ τα σώματα ψεκάζονται με οξύ και καίγονται, ώστε να μην είναι αναγνωρίσιμα. Οι φήμες αυτές γνωστές σε πολλούς κατοίκους της περιοχής, προέρχονταν από μαρτυρίες Μπολσεβίκων στρατιωτών, μεταξύ των οποίων και ο γνωστός Pyotr Ermakov. Σήμερα, έγγραφα, συνεντεύξεις και μερικά από τα όπλα που χρησιμοποιήθηκαν στην εκτέλεση, πολλά από τα οποία φέρουν την υπογραφή των εκτελεστών, φυλάσσονται σε κρατικά μουσεία και αρχεία. Το σπίτι δε της οδού Voznesensky 49, στο ισόγειο του οποίου πραγματοποιήθηκαν οι εκτελέσεις, ονομαζόταν για αρκετά χρόνια μετά «Μουσείο Εκδίκησης των Λαών» και κατεδαφίστηκε εν μία νυκτί το 1977, επί δημαρχίας Μπόρις Γιέλτσιν (1931-2007), μετέπειτα πρόεδρου (1991-1999) της Ρωσικής Ομοσπονδίας. Πολλά χρόνια αργότερα, στα μέσα της δεκαετίας του 1970, ανακαλύφθηκε από τον γεωλόγο Dr Alexander Avdonin (1932- ) και τον φίλο του, συγγραφέα και σκηνοθέτη Geli Ryabov (1932-2015), ο ομαδικός τάφος της αυτοκρατορικής οικογένειας. Υπήρχαν υποψίες ότι επρόκειτο για τις σορούς του τσάρου Νικόλαου Β' και της οικογένειάς του, (με εξαίρεση τα δύο από τα παιδιά της οικογένειας, Αλεξέι και Μαρία). Ωστόσο, μόλις λίγο μετά την πτώση της Σοβιετικής Ένωσης, το 1991, οι Avdonin και Ryabov αποκαλύπτουν το μυστικό, οπότε και ξεκίνησε επίσημα η εκταφή των σορών. Ένα χρόνο αργότερα, το 1992, η υπηρεσία εγκληματολογικών ερευνών (Forensic Science Service, FSS) του Ηνωμένου Βασιλείου προσεκλήθη από τις Ρωσικές αρχές να ξεκινήσουν από κοινού μια Αγγλο-ρωσική προσπάθεια για την εξακρίβωση της ταυτότητας των σορών, εφαρμόζοντας ανάλυση DNA. Η διεξαγωγή του ελέγχου ανατέθηκε σε έναν από τους κορυφαίους εγκληματολόγους στον κόσμο, τον Dr Peter Gill, εργαζόμενο τότε στο FSS, και το Ρώσο γενετιστή Dr Pavel Ivanov, ενώ η Dr Erica Hagelberg, από το πανεπιστήμιο του Cambridge, κλήθηκε με σκοπό να επαληθεύσει τα ευρήματα των Gill και Ivanov.

Η DNA Ιατροδικαστική εξέταση από τους Gill και συν. στόχευε αρχικά στις μικρές επαναλαμβανόμενες περιοχές αυτοσωμικού DNA (autosomal Short Tandem Repeats, aSTRs) που εντοπίζονται σε μη κωδικοποιημένες περιοχές, χωρίς όμως ικανοποιητικά αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε ένα σύνολο πέντε aSTRs γενετικών δεικτών: VWA, TH01, F13A1, FES / FPS και ACTBP2 (SE33). Κάθε aSTR γενετικός δείκτης χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση του ληφθέντος βιολογικού υλικού, για κάθε ένα από τα εννέα μηριαία οστά, τα οποία ανακτήθηκαν από τον ομαδικό τάφο (και όπως αποδείχτηκε αργότερα των σορών του τσάρου Νικόλαου Β', της τσαρίνας Αλεξάνδρας Fyodorovna, των τριών θυγατέρων τους Όλγας, Τατιάνας, Αναστασίας και τεσσάρων από το έμπιστο προσωπικό τους, Dr. Evgeny Botkin, Anna Demidova, Ivan Kharitonov και Alexei Trupp). Με δεδομένο ότι εκείνη την περίοδο ο έλεγχος DNA μέσω των aSTRs γενετικών δεικτών ήταν σε πρώιμο στάδιο μελέτης, οι δείκτες αυτοί χρησιμοποιήθηκαν μόνο ως εργαλείο διάκρισης του κάθε σκελετικού υπολείμματος και συγκεκριμένα για τον προσδιορισμό του φύλου και για να αποδειχτεί η συγγενική σχέση μεταξύ των σορών.

Αργότερα οι Gill και συν. προχώρησαν στον προσδιορισμό του προφίλ του μιτοχονδριακού DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) των σορών και η ανάλυσή του χρησιμοποιήθηκε στον έλεγχο της συγγενικής σχέσης τόσο του τσάρου, όσο και της τσαρίνας με απογόνους τους από την μητρική γενεαλογία. (Εικόνα 2) Στις περιπτώσεις κατά τις οποίες σωματικά υγρά ή ιστός δεν είναι διαθέσιμα, το κυκλικό mtDNA μπορεί να απομονωθεί από τα οστά και να αναλυθεί, δεδομένου ότι είναι πιθανότερο να επιβιώσει για μεγάλες χρονικές περιόδους σε σύγκριση με το χρωμοσωματικό DNA. Επίσης, είναι ιδιαίτερα κατάλληλο σε μελέτες ελέγχου συγγένειας μεταξύ των ατόμων,

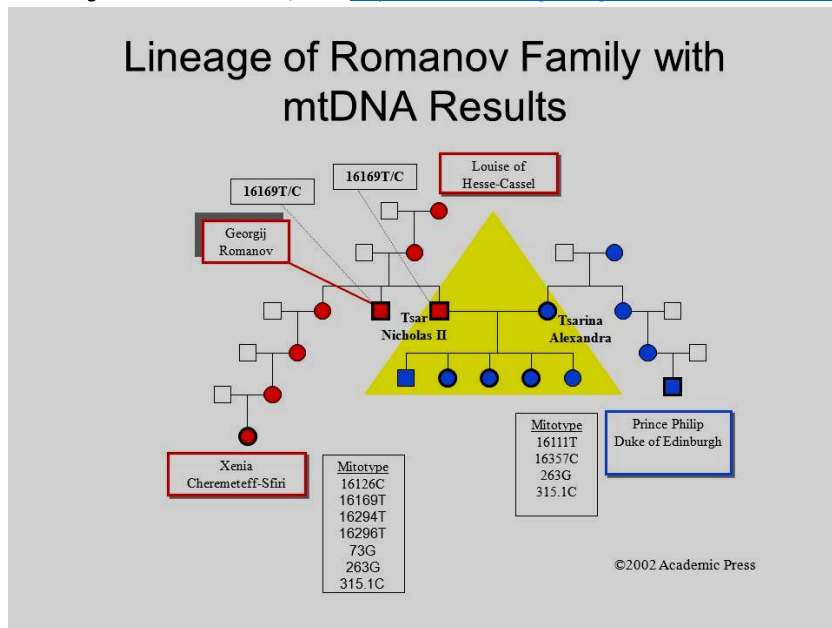
ιδίως όταν παρεμβάλλονται αρκετές γενεές μεταξύ προγόνων και απογόνων τους. Αυτό το οποίο αναλύεται μέσω αλληλουχίας είναι οι υπερμεταβλητές περιοχές (hypervariable regions, HVI και HVII, μήκους 342 και 268 bp αντιστοίχως). Οι παραλλαγές που εντοπίζονται στις περιοχές αυτές αποτελούν μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs). Η σύγκριση του mtDNA απλοτύπου της αυτοκράτειρας Αλεξάνδρα Fyodorovna (mitotypes, το σύνολο των SNPs τα οποία συναντώνται μαζί στο ίδιο μιτοχondριακό γονιδίωμα), με αυτόν του εν ζωή, επιβεβαιωμένου μακρινού εξαδέλφου της από την μητρική γενεαλογία, HRH πρίγκιπα Φιλίππου της Μεγάλης Βρετανίας, έδειξε απόλυτη ταύτιση στις HVI και HVII περιοχές. Ωστόσο, ο έλεγχος του mtDNA στο δείγμα που ελήφθη από το μηριαίο οστό του τσάρου Νικόλαου Β΄ δεν έδωσε ξεκάθαρες απαντήσεις. Κατεγράφη η παρουσία ετεροπλασμίας C/T (heteroplasmy) στη θέση 16.169, ενώ τα γενετικά δεδομένα, τα οποία ελήφθησαν από συγγενείς της μητρικής γενεαλογίας (πριγκίπισσα Xenia Cheremeteff Sfirι και δούκας του Fife), έδειξαν ομοπλασμία στην αντίστοιχη θέση για την νουκλεοτιδική βάση της θυμίνης (T). (Εικόνα 3)

Οι ετεροπλασμικές καταστάσεις δηλ. η παρουσία δύο διαφορετικών κλώνων mtDNA στο ίδιο κύτταρο ή στον ίδιο ιστό, διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: ετεροπλασμία νουκλεοτιδικής αλληλουχίας και ετεροπλασμία μήκους. Στην πρώτη αναφέρεται κάθε περίπτωση κατά την οποία ένα άτομο φέρει δύο πληθυσμούς μιτοχondριακών γονιδιωμάτων που διαφέρουν σε μία μόνο θέση της αλληλουχίας τους. Στη δεύτερη περίπτωση ανάμεσα σε δύο πληθυσμούς μιτοχondριακών γονιδιωμάτων του ίδιου ατόμου εμφανίζονται παραλλαγές στο μήκος ορισμένων τμημάτων των περιοχών HVI και HVII, που αποτελούνται από διαδοχικές κυτοσίνες (C). Μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του '80 θεωρούνταν ότι το ετεροπλασμικό mtDNA ήταν εξαιρετικά «σπάνια» κατάσταση, αν όχι ανύπαρκτη. Σήμερα, είναι γνωστό ότι όλα τα άτομα εμφανίζουν κάποιο βαθμό ετεροπλασμίας και οφείλεται στην υψηλή συχνότητα με την οποία συμβαίνουν μεταλλαγές στο mtDNA. Στην πορεία της εξέλιξης μέσω της φυσικής επιλογής ορισμένες μεταλλαγές του μιτοχondριακού γονιδιώματος διατηρούνται και εδραιώνονται, ενώ άλλες χάνονται. Αναγνωρίζεται δε εύκολα, αν η μέθοδος ανίχνευσης είναι αρκετά ευαίσθητη. Στην επιβεβαίωση αυτής της θεωρίας συνέβαλλε η μελέτη των Bendall και συν. οι οποίοι διαπίστωσαν μία ευρέως διαδεδομένη ετεροπλασμία νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μεταξύ ομοζυγωτικών διδύμων αδελφών.

Όπως ήταν αναμενόμενο, η προφανώς «σπάνια» κατάσταση ετεροπλασμίας στον τσάρο, δημιούργησε διχασμό μεταξύ επιστημόνων και μη επιστημόνων. Αποφασίζεται να διεξαχθούν πρόσθετες δοκιμασίες από το Εργαστήριο DNA Ταυτοποίησης των Ενόπλων Δυνάμεων της Ρωσικής Κυβέρνησης (Armed Forces DNA Identification Laboratory, AFDIL). Το mtDNA της σορού που θεωρείτο ότι ανήκε στον τσάρο συγκρίθηκε με αυτό του νεότερου αδερφού του, μεγάλου δούκα Georgij Ρομανώφ (1866-1919), η σορός του οποίου βρισκόταν ενταφιασμένη σε μαρμάρινη σαρκοφάγο. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μελετών και οι δύο εμφάνισαν ετεροπλασμία αλληλουχίας. Στη θέση 16.169 εντοπίζονταν το νουκλεοτίδιο της κυτοσίνης ή της θυμίνης (C/T) αντί της θυμίνης (T), τα οποία εντοπίζονταν στους ζώντες συγγενείς τους, γεγονός που αποτέλεσε ισχυρή ένδειξη ότι η ανακτηθείσα σορός ανήκε στον τσάρο Νικόλαο Β΄. Μετά από αυτή την εκτενή ανάλυση, η βρετανική FSS κατέληξε στο συμπέρασμα ότι τα ανακτηθέντα οστά ανήκουν στον τελευταίο τσάρο και την οικογένειά του. Δυστυχώς, αυτό δεν ήταν το τέλος της ιστορίας. Πριν καλά-καλά στεγνώσει το μελάνι των δύο εκθέσεων ταυτοποίησης των μελών της Ρωσικής αυτοκρατορικής οικογένειας και παρά τα συντριπτικά στοιχεία για την αναγνώριση της ταυτότητας της οικογένειας των Ρομανώφ, κατά τα τέλη της δεκαετίας του 1990 αρχές του 2000, ένας μικρός, αλλά όχι ασήμαντος αριθμός επιστημόνων προσπάθησε να εγείρει αμφιβολίες για την αξιοπιστία των αναλύσεων DNA. Σε αυτό ίσως έπαιξε κάποιο ρόλο και η άρνηση της Ρωσικής Ορθόδοξης Εκκλησίας να αποδεχθεί το 1998 την αναγνώριση, εξαιτίας της αβεβαιότητας των τότε αναλύσεων DNA. Η πρώτη αμφισβήτηση ήρθε από τον Ιάπωνα επιστήμονα Tatsuo Nagai το 1997. Ο Nagai ανέπτυξε το γενετικό προφίλ του Νικόλαου Β΄, λαμβάνοντας δείγμα από το ματωμένο μαντήλι το οποίο χρησιμοποιήθηκε κατά την αποτυχημένη απόπειρα δολοφονίας του στη διάρκεια επίσημης επίσκεψης στην Ιαπωνία (1891, Ōtsu incident), όταν ήταν ακόμη τσάρεβιτς, δηλ. διάδοχος του θρόνου. Τον συνόδευε και του έσωσε τη ζωή, ο εξάδελφός του, πρίγκιπας Γεώργιος της Ελλάδας και της Δανίας (1869-1957), ύπατος αρμοστής της Κρητικής Πολιτείας (1898-1906), σύζυγος της Μαρίας Βοναπάρτη, δευτερότοκος γιός του Βασιλιά της Ελλάδας Γεωργίου Α΄ και της Όλγας.

Ο Nagai δήλωσε ότι το αναλυθέν γενετικό προφίλ δεν ταιριάζει με τα αποτελέσματα των Gill και συν. Αν και αυτή η μελέτη δεν αξιολογήθηκε ή δεν δημοσιεύτηκε ποτέ, έδωσε λαβές στους "αμφισβητίες" να διατυπώσουν αμφιβολίες σχετικά με την αυθεντικότητα των σορών που ανακτήθηκαν στο Ekaterinburg. Αργότερα, το 1999, ο Nagai σε μια προσπάθεια συνεργασίας του με τον Ρώσο επιστήμονα Dr Vyacheslav Popov, εξετάζοντας mtDNA από 25 δείγματα τριχών του μεγάλου δούκα Georgii Ρομανώφ, προσπάθησε και πάλι να διαψεύσει την αξιοπιστία του DNA ελέγχου. Αναφέρθηκαν ειδικά στη θέση 16.169, στην οποία κατεγράφη μόνο η ανάστροφη ακολουθία αναφοράς (revised Cambridge Reference Sequence, rCRS), χωρίς καμία ένδειξη ετεροπλασμίας και σε επτά διαφορετικές ετεροπλασμικές νουκλεοτιδικές θέσεις στον Georgii Ρομανώφ, οι οποίες έφεραν μείγμα δύο νουκλεοτιδικών βάσεων (16.093 T/C, 16.278 C/T, 16.298 T/C, 16.325 T/C, 16.327 C/T, 16.356 T/C και 16.362 T/C), και οι οποίες δεν εμφανίζονταν στον τσάρο Νικόλαο Β'. Αργότερα, οι έμπειροι εγκληματολόγοι Melton και συν., θα χαρακτηρίσουν τα αποτελέσματα των Nagai και συν. ως μη αξιόπιστα λόγω επιμόλυνσης και θα διατυπώσουν την άποψη ότι οι τρίχες με τα χρόνια παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα παραγωγής ενός πλήρους γενετικού προφίλ, καθώς και αυξημένη πιθανότητα καταγραφής "ετεροπλασμικών" δειγμάτων. Οι δε Nagai και συν. δεν έδωσαν ποτέ καμία εξήγηση για την εμφάνιση του υψηλού ποσοστού ετεροπλασμικών θέσεων στις τρίχες του Georgii. Η απάντηση ήρθε το 2008, όταν δύο διαφορετικά Ρωσικά Εργαστήρια πραγματοποίησαν έλεγχο σε δείγμα DNA που ελήφθη από το πουκάμισο που ο Νικόλαος Β' φορούσε κατά την διάρκεια της επίθεσης στην Ιαπωνία και το οποίο φυλασσόταν στο Hermitage στην Αγ. Πετρούπολη. Το πλήρες aSTR γενετικό προφίλ και ο Y-STR απλότυπος του τσάρου ταίριαξαν απόλυτα με το μεταθανάτιο γενετικό προφίλ που αναπτύχθηκε από τα σκελετικά υπολείμματα.

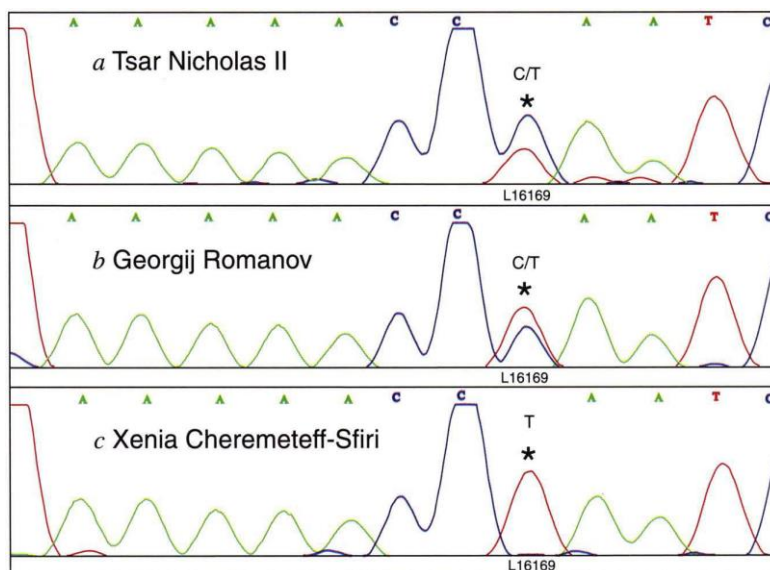
Coble Investigative Genetics 2011, 2:20 <http://www.investigativegenetics.com/content/2/1/20>



**Εικόνα 2.** Το mtDNA γενεαλογικό δέντρο της οικογένειας των Ρομανώφ. Η ταυτοποίηση της Μαρίας και Αναστασίας δεν ήταν δυνατή μόνο με ανάλυση DNA. J.M. Butler (2002) *Forensic DNA Typing 2<sup>nd</sup> Edition* 2002 Elsevier Academic Press.

Η δεύτερη αμφισβήτηση των αποτελεσμάτων DNA των Gill και συν. προήλθε από το εργαστήριο του Dr Alec Knight στο Πανεπιστήμιο του Stanford και η σχετική μελέτη δημοσιεύθηκε στο περιοδικό *Annals of Human Biology*. Η ομάδα του Knight ισχυρίστηκε ότι η ενίσχυση ενός σχετικά μεγάλου γονιδιακού θραύσματος (περίπου 1200 ζεύγη βάσεων, bp) από ένα αποδομημένο δείγμα, όπως αυτά που ανακτήθηκαν από τον ομαδικό τάφο

του Ekaterinburg, δεν ήταν δυνατή και ότι τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από τους Gill και συν. ήταν πιθανότατα επιμολυμένα από εξωγενές (σύγχρονο) DNA. Στα συμπεράσματα αυτά κατέληξαν διεξάγοντας μελέτη σε οστό δακτύλου, που φερόταν να είναι από την αδελφή της αυτοκράτειρας Αλεξάνδρας Fyodorovna, Elisabeth (1864-1918, γνωστή και ως "Ella").



**Εικόνα 3.** mtDNA ανάλυση της τελευταίας αυτοκρατορικής οικογένειας της Ρωσίας. Η σύγκριση του mtDNA στην θέση 16169 για τον καθ' υπόθεση Τσάρο Νικόλαο Β' και αδελφό του Μεγάλο Δούκα Georgij Ρομανώφ κατέγραψε ετεροπλασμία C/T, ενώ για την πριγκίπισσα Xenia Cheremeteff Sfiri ομοπλασμία στην αντίστοιχη θέση για την νουκλεοτιδική βάση της T.  
Ivanov et al (1996) Nature Genetics 12, 417-420 (<http://www.nature.com/naturegenetics>)

Η Ella ήταν παντρεμένη με τον θείο του τσάρου Νικόλαου, μεγάλο δούκα Sergei Ρομανώφ (1857-1905) και το 1909, μετά το θάνατο του συζύγου της, αφιέρωσε το υπόλοιπο της ζωής της στην Ορθόδοξη Ρωσική Εκκλησία ως μοναχή. Η ίδια, μαζί με αρκετούς άλλους συγγενείς των Ρομανώφ, θανατώθηκαν μία ημέρα μετά την εκτέλεση της οικογένειας του Νικολάου το 1918. Η σορός της ανακτήθηκε από χωρικούς κοντά στο Alaraevsk, 18 km από το Ekaterinburg. Οι ερευνητές υποστήριξαν ότι η ομάδα του Gill δεν είχε ενισχύσει το ενδογενές DNA των σορών του Ekaterinburg, δεδομένου ότι το επιβεβαιωμένο δείγμα αναφοράς του HRH πρίγκιπα Φιλίππου που χρησιμοποιήθηκε από την ομάδα του Gill δεν ταιριάζει με την αλληλουχία της Ella και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο αρχικός έλεγχος DNA των δειγμάτων των Ρομανώφ ήταν μη αξιόπιστος.



**Εικόνα 4.** Το σημείο στο οποίο οι τρεις ερασιτέχνες αρχαιολόγοι ανακάλυψαν τις σορούς των δύο παιδιών Αλεξί και Μαρία Ρομανώφ το καλοκαίρι του 2007, σε απόσταση 70 μ. από τον ομαδικό τάφο του Ekaterinburg, όπου 30 χρόνια πριν βρέθηκε η σορός του Τσάρου Νικολάου Β'. (Φωτογραφία: Dr Sergei Nikitin και Peter Sarandinaki (<http://www.searchfoundationinc.org/>))

Ωστόσο, το μυστήριο έφτασε στο τέλος του το καλοκαίρι του 2007, όταν τρεις ερασιτέχνες Ρώσοι αρχαιολόγοι, ανακάλυψαν 44 θραύσματα οστών και δοντιών (Εικόνες 4 και 5) σε απόσταση 70 μ. από το σημείο, όπου βρέθηκαν 30 χρόνια πριν η σορός του Τσάρου Νικολάου Β'. Η επακόλουθη επανεξέταση του αρχαϊκού υλικού και η απόδειξη από την ανάλυση ότι οι δύο σειρές σκελετικών υπολειμμάτων ανήκαν στα δύο παιδιά της αυτοκρατορικής οικογένειας, Αλεξέι και Μαρία, οδήγησαν στην ολοκλήρωση των επιστημονικών ερευνών και η ταυτοποίηση των Ρομανώφ αποσαφηνίστηκε. Σήμερα, τα σκελετικά υπολείμματα της οικογένειας των Ρομανώφ βρίσκονται ενταφιασμένα από το 1998, στο Φρούριο Πέτρου και Παύλου στην Αγία Πετρούπολη.



**Εικόνα 5.** Σκελετικά υπολείμματα που ανακτήθηκαν από το χώρο του 2007. Φωτογραφία: Dr Sergei Nikitin και Peter Sarandinaki (<http://www.searchfoundationinc.org/>)

Πέρασαν σχεδόν 20 χρόνια προσπαθειών ελέγχου, επαλήθευσης, αναπαραγωγής και επιβεβαίωσης των μελετών στις σορούς των μελών της αυτοκρατορικής οικογένειας χρησιμοποιώντας mtDNA, aSTRs και Y-STRs. Οι αρχικές προσπάθειες ταυτοποίησης (από το 1993 έως το 1996) αποτέλεσαν μία κρίσιμη στιγμή για τις δοκιμασίες DNA στην Ιατροδικαστική και παρά τις προσπάθειες να δυσφημιστούν αυτές οι μελέτες, τα αποτελέσματα άντεξαν τη δοκιμασία του χρόνου και ήταν πλέον καιρός να σταματήσει αυτή η διαμάχη. Παράλληλα, η εν λόγω έρευνα, συνέβαλε σημαντικά στην ανάπτυξη, εξέλιξη και αποδοχή των aSTRs πολυμορφισμών, καθώς ήταν το πρώτο περιστατικό ελέγχου με χαμηλή συγκέντρωση DNA. Τέλος, η έρευνα των Gill και συν. ήταν η πρώτη Ιατροδικαστική υπόθεση, που απέδειξε τη χρησιμότητα ανάλυσης του mtDNA σε αρχαϊκά αποδομημένα βιολογικά δείγματα. Σήμερα, η ταυτοποίηση των σορών που ανακτήθηκαν από τον πρώτο τάφο το 1991, αποτελεί το πιο γνωστό περιστατικό ανάλυσης ετεροπλάσμιου DNA και αναφέρεται ως παράδειγμα στα σχετικά εγχειρίδια. Το γεγονός ότι οι σοροί των δύο αγνοουμένων παιδιών της αυτοκρατορικής οικογένειας βρέθηκαν σχεδόν 30 χρόνια μετά την ανακάλυψη του πρώτου ομαδικού τάφου ήταν ευτυχής συγκυρία, διότι ήρθε όταν η επιστήμη ήταν πια σε θέση να ταυτοποιήσει τις σορούς. Η τεράστια πρόοδος στην ανάλυση του ανασυνδυασμένου DNA οδήγησε τελικά στην αναγνώριση ολόκληρης της αυτοκρατορικής οικογένειας των Ρομανώφ και στο κλείσιμο της υπόθεσης.



## Ενδεικτική Βιβλιογραφία

1. Coble MD, Loreille OM, Wadhams MJ, et al. Mystery solved: the identification of the two missing Romanov children using DNA analysis. *PLoS One* 2009, 4:e4838.
2. Wambaugh J. *The Bleeding New York: William Morrow & Co; 1989.* 5. Hammer J: Resurrecting the czar: in Russia, the recent discovery of the remains of the two missing Romanov children has pitted science against the church. *Smithsonian* 2010 [<http://www.smithsonianmag.com/people-places/Resurrecting-the-Czar.html#ixzz1Y8We4Giw>].
3. Massie RK. *The Romanovs: The Final Chapter* New York: Random House; 1995.
4. Gill P, Ivanov PL, Kimpton C, et al. Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nat Genet* 1994, 6:130-135.
5. Kimpton C, Fisher D, Watson S, Adams M, Urquhart A, Lygo J, Gill P. Evaluation of an automated DNA profiling system employing multiplex amplification of four tetrameric STR loci. *Int J Legal Med* 1994, 106:302-311.
6. Monnat RJ Jr, Loeb LA. Nucleotide sequence preservation of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985, 82:2895-2899.
7. Holt IJ, Miller DH, Harding AE. Genetic heterogeneity and mitochondrial DNA heteroplasmy in Leber's hereditary optic neuropathy. *J Med Genet* 1989, 26:739-743.
8. Howell N, Halvorson S, Kubacka I, McCullough DA, Bindoff LA, Turnbull DM. Mitochondrial gene segregation in mammals: is the bottleneck always narrow? *Hum Genet* 1992, 90:117-120.
9. Bendall KE, Macaulay VA, Baker JR, Sykes BC. Heteroplasmic point mutations in the human mtDNA control region. *Am J Hum Genet* 1996, 59:1276-1287.
10. Ivanov PL, Wadhams MJ, Roby RK, Holland MM, Weedn VW, Parsons TJ. Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II. *Nat Genet* 1996, 12:417-420.
11. Nelipa M, Azar H: Romanov imperial bones revisited: why does doubt remain about who is buried in the St. Petersburg fortress? (Part 1). *Eur R Hist J* 2006, 9:24-32.
12. Rogaev EI, Grigorenko AP, Moliaka YK, Faskhutdinova G, Goltsov A, Lahti A, Hildebrandt C, Kittler EL, Morozova I: Genomic identification in the historical case of the Nicholas II royal family. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, 106:5258-5263.
13. Nagai T, Araki N, Yuko Yanagisawa, Popov VL: DNA identification of Georgij Romanov, a direct brother of the Russian Tsar Nicolas II: sequence of mitochondrial DNA. *Igaku To Seibutsugaku* 1999, 139:247-251.
14. Melton T, Dimick G, Higgins B, Lindstrom L, Nelson K: Forensic mitochondrial DNA analysis of 691 casework hairs. *J Forensic Sci* 2005, 50:73-80.
15. Knight A, Zhivotovsky LA, Kass DH, Litwin DE, Green LD, White PS, Mountain JL: Molecular, forensic and haplotypic inconsistencies regarding the identity of the Ekaterinburg remains. *Ann Hum Biol* 2004, 31:129-138.
16. Knight A, Zhivotovsky LA, Kass DH, Litwin DE, Green LD, White PS: Ongoing controversy over Romanov remains. *Science* 2004, 306:407-410.
17. Zhivotovsky LA: Recognition of the remains of Tsar Nicholas II and his family: a case of premature identification? *Ann Hum Biol* 1999, 26:569-577.
18. J.M. Butler (2002) *Forensic DNA Typing 2<sup>nd</sup> Edition* 2002 Elsevier Academic Press
19. <https://en.wikipedia.org/wiki/AlexanderAvdonin>
20. Michael D Coble. *The identification of the Romanovs: Can we (finally) put the controversies to rest?* *Investigative Genetics* 2011, 2:20. Οἶκος των Ρομανώφ  
[https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%9F%CE%AF%CE%BA%CE%BF%CF%82\\_%CF%84%CF%89%CE%BD\\_%CE%A1%CE%BF%CE%BC%CE%B1%CE%BD%CF%8E%CF%86](https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%9F%CE%AF%CE%BA%CE%BF%CF%82_%CF%84%CF%89%CE%BD_%CE%A1%CE%BF%CE%BC%CE%B1%CE%BD%CF%8E%CF%86)
21. [https://www.academia.edu/18174729/The\\_Romanov\\_Assassination\\_Records\\_Reports\\_and\\_DNA](https://www.academia.edu/18174729/The_Romanov_Assassination_Records_Reports_and_DNA)
22. Saul Toby. *Death of a dynasty: How the Romanovs met their end.* *National geographic* July 20, 2018. [https://www.nationalgeographic.com/history/magazine/2018/07-08/romanov-dynasty-assassination-russia-history/#/album\\_alb268467](https://www.nationalgeographic.com/history/magazine/2018/07-08/romanov-dynasty-assassination-russia-history/#/album_alb268467)

## Απογευματινά Μαθήματα EEKX-KB

Η Επιστημονική- Εκπαιδευτική Επιτροπή της EEKX-KB, μετά από πρόταση της Επιτροπής Νέων, αποφάσισε την συνέχιση των κύκλων των απογευματινών μαθημάτων για τους νέους συναδέλφους. Την παρούσα ακαδημαϊκή χρονιά πραγματοποιείται ο 3<sup>ος</sup> κύκλος των απογευματινών μαθημάτων της εταιρείας (ο κάθε κύκλος έχει διάρκεια δύο ακαδημαϊκών ετών) στον οποίο συμμετέχουν 167 άτομα.

Τα απογευματινά μαθήματα έχουν διάρκεια 2 ώρες (7-9 μ.μ. το απόγευμα) με κύριο θέμα την παρουσίαση των *in vitro* διαγνωστικών εργαστηρίων. Συγκεκριμένα, παρουσιάζονται οι εξετάσεις, καθώς και η μεθοδολογία που ακολουθείται στο Βιοχημικό, Ανοσολογικό, Αιματολογικό, Μικροβιολογικό, Κυτταρολογικό και Παθολογοανατομικό και Μοριακής Διαγνωστικής εργαστήριο, καθώς και στην Αιμοδοσία.

Η εγγραφή στον κύκλο μαθημάτων είναι δωρεάν και αποτελεί προσφορά της Εταιρείας μας στους νέους συναδέλφους μας, ενώ με την ολοκλήρωση των μαθημάτων χορηγείται στους συμμετέχοντες βεβαίωση παρακολούθησης.

**Αξίζει να σημειωθεί ότι την φετινή ακαδημαϊκή χρονιά ορισμένα από τα απογευματινά μαθήματα πραγματοποιούνται διαδικτυακά λόγω της έξαρσης του κορωνοϊού στη χώρα μας.**

## IFCC eNewsFlash March 2020 Special Issue:

### ◆ New Dates IFCC WorldLab Congress in Seoul – January 2021

e**newsflash** 



#### New Dates IFCC WorldLab Congress in Seoul – January 2021



On behalf of the IFCC Executive Board, we are delighted to inform you that the WorldLab Congress in Seoul has been rescheduled to January 6-10, 2021. The new dates were chosen based on the recommendation of the local organizing committee as well as congress and hotel space availability. Suitable space was not available during fall of 2020.

We are looking forward to welcoming all our invited speakers, registered delegates, and exhibitors to this rescheduled conference in the beautiful city of Seoul. We also apologize for any inconvenience caused by rescheduling the conference and hope to see all of you at this important international event to celebrate the end of the COVID-19 epidemic!



The Organising Secretariat MZ Congressi will be contacting all parties involved (Speakers, Sponsors & Exhibitors, Delegates, Poster Presenters, and others) with further information.

Kind regards,

Professor Maurizio Ferrari, IFCC President

Professor Khosrow Adeli, IFCC President-Elect

**Stay connected with IFCC & get all the latest news!**

**Subscribe at: <http://www.ifcc.org/contact/>**

**Follow us on:**

## Henry Charles Bukowski (1920-1944), Βροχή

<p>Μια συμφωνική ορχήστρα. Έχει καταιγίδα. Παίζουν μιαν εισαγωγή του Βάγκνερ. Ο κόσμος παρατά τα καθίσματα κάτω απ' τα δέντρα και τρέχει στο υπόστεγο. Οι γυναίκες χαχανίζουν, οι άντρες παριστάνουν τους ψύχραιμους, τα μουσκεμένα τσιγάρα πετιούνται παραπέρα. Ο Βάγκνερ συνεχίζεται κι όλοι είναι κάτω απ' το υπόστεγο. Ακόμη και τα πουλιά αφήνουν τα δέντρα κι έρχονται από κάτω. Ακολουθεί η Ουγγρική Ραψωδία #2 του Λιστ και βρέχει ακόμη. Όμως, κοιτάξτε! Ένας άντρας κάθεσαι μόνος στη βροχή και ακούει προσεκτικά. Το ακροατήριο τον παρατηρεί. Γυρίζουν και κοιτάζουν. Η ορχήστρα κάνει τη δουλειά της. Ο άντρας κάθεσαι μέσα στη νύχτα, στη βροχή και ακούει προσεκτικά. Κάτι δεν πάει καλά μ' αυτόν – σχολιάζουν. Αυτός ήρθε για ν' ακούσει τη μουσική.</p>	<p>A symphony orchestra. There is a thunderstorm, they are playing a Wagner overture and the people leave their seats under the trees and run inside to the pavilion. The women giggling, the men pretending calm, wet cigarettes being thrown away, Wagner plays on, and then they are all under the pavilion. The birds even come in from the trees and enter the pavilion and then it is the Hungarian Rhapsody #2 by Liszt, and it still rains, but look, One man sits alone in the rain listening. The audience notices him. They turn and look. The orchestra goes about its business. The man sits in the night in the rain, listening. There is something wrong with him, isn't there? He came to hear the music.</p>
--	---

- <https://www.americanpoems.com/poets/charles-bukowski/rain/>
- Franz Liszt (1811-1886), Hungarian Rhapsody No.2 (Orchestra version). The Philharmonia Orchestra, Herbert Von Karajan: The Classical Hall of Fame, Volume 3. <https://www.youtube.com/watch?v=goeOUTRy2es>
- Antonio Vivaldi (Βενετία 1678, Βιέννη 1741): A Rain of Tears "Sento in seno ch'in pioggia di lagrime". From Vivaldi's Tieteburga and Giustino. G. Anderson and E.J. Roe, When Words Fade (Night Songs for Piano Duo), Steinway Record Label. <https://www.youtube.com/watch?v=fVv5kGPrqGk&feature=youtu.be>

In memoriam. Θάνατος Μικρούτσικος (Πάτρα 1947 – Αθήνα 2019): Συναυλία του Θάνατου Μικρούτσικου πάνω στο έργο του Νίκου Καββαδία. <http://www.kke.gr/> και <https://www.youtube.com/watch?v=5TSDNEg4rMk>

Να πέσεις στην αγάπη της και να μη σε θέλει...



Παραμονές του Αγίου Βαλεντίνου στην Αργυρούπολη. Οι τρεις ιππότες της γατούλας: ο υπομονετικός μελαχρινός, ο αδιάφορος καστανός και ο "δεν κρατιέμαι" παρά τῆ ρίζα του δένδρου.

