

## AMES TEST – Il saggio di mutagenicità in vitro.

Ideato da Ames negli anni settanta, il test di Ames viene utilizzato per l'analisi della mutagenicità in una sostanza.

### PRINCIPIO DEL TEST

E' una mutazione all'indietro (revertante), è in vitro quindi non utilizza animali, è più veloce ed economica rispetto alla sperimentazione in vivo.

Il principio si basa su ceppi batterici mutati AUXOTROFI (incapaci di produrre sostanza vitale). Solitamente vengono usati i ceppi batterici deficienti di *Salmonella Thyphimurium* (His), incapaci di produrre istidina e i ceppi deficienti di *E.Coli*, incapaci di produrre i Triptofano (Trp).

Le mutazioni puntiformi vengono effettuate nell'operone dell'istidina ( in *Salmonella*) e nell'operone del triptofano (nell'*E.coli*) rendendo i batteri incapaci di produrre l'amminoacido corrispondente (ceppi mutati auxotrofi).

I risultati di queste mutazioni rendono gli organismi incapaci di crescere senza His o Trp.

Quando si verifica un evento mutageno, per sostituzione di basi o frame-shifts, all'interno del gene si verifica un ritorno alla produzione dell'amminoacido (ceppi prototrofi). Questi ceppi revertanti cresceranno in terreno povero rispettivamente di His e Trp.

### L'Ames test è molto utilizzato in ambito biomedico e farmaceutico-industriale per:

- analisi ambientali
- analisi sperimentali di nuove molecole
- controllo delle sostanze chimiche utilizzate per produrre i farmaci i quali, non per caso, devono seguire obbligatoriamente il test di **GENOTOSSICITA'** sui batteri (direttiva 67/548/CEE)
- analisi dei prodotti cosmetici
- dispositivi medici.

## **L'Ames test classico**

Viene effettuato piastrando i batteri su un terreno solido di agar contenente una minima quantità di istidina e ponendo al centro della piastra un disco contenente la sostanza in esame, che poi si diffonde nel terreno. La presenza delle tracce di amminoacido nel terreno permette di individuare mutazioni che, per manifestarsi fenotipicamente, richiedono più cicli di duplicazione cellulare.

La frequenza delle mutazioni ottenute viene valutata in base alla distanza dell'alone di "non crescita" dal disco dopo 48 ore di incubazione, in rapporto ad una piastra di mutazioni.

Anche se fino a poco tempo fa l'Ames test classico è stato considerato il test più sicuro e più comunemente usato al mondo, con l'enorme aumento del numero di sostanze che necessitano questo tipo di test, la sua applicazione ai fini di screening è diventata poco pratica per i seguenti motivi:

- troppo laboriosa
- richiede troppa sostanza posta sotto il test
- richiede troppo tempo.

## **AMES TEST MPF (Micro Plate Format) di marchio Xenometrix**

E'una modifica del classico Ames test, in formato piastra microtiter che presenta una validissima alternativa, in quanto, pur rimanendo fedele ai principi di Ames test classico, offre numerosi vantaggi, quali:

- più veloce
- ceppi batterici controllati e con caratteristiche certe (nessuna necessità dell'analisi di genotipo)
- colorimetrico (più chiara interpretazione)
- in formato piastra microtiter (meno laborioso, più facile e pratico)
- più economico (richiede 6 volte meno la quantità della plasticheeria)



La tecnica “end-point multiparametrica” diminuisce notevolmente sia il consumo del campione che la manualità stessa. Inoltre, elimina la potenziale variabilità fra i test eseguiti separatamente, causati dalla necessità di un maggior numero di passaggi.

L'AMES MPF Xenometrix segue le richieste della **OECD 471** per l'analisi di sostanze chimiche:

**Almeno 5 Ceppi Batterici:**

- TA98 +/- S9
- TA100 +/- S9
- TA1537 or TA97 or TA97a +/- S9
- TA1535 +/- S9
- TA102 or *E.coli* wp2.... +/- S9

**Metodi richiesti:**

- Plate incorporation method
- Preincubation method
- Fluctuation method
- Suspension method

**Quantità e Controlli richiesti:**

- Quantità di composto raccomandata: 5mg/piastra o 5µl/piastra
- Attivazione metabolica raccomandata: +/- S9-medium
- Triplicato
- Controlli negativo e positivo
- 5 dilutioni

Nell'Ames MPF vengono utilizzati i ceppi di *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535 e TA1537, ed i ceppi di *E. coli* WP2 [pKM101] e WP2 uvrA.

Il TA100, il TA1535 ed l'*E.coli* sono utilizzati per la rivelazione di mutazioni per sostituzione di base mentre il TA98 e TA1537 sono utilizzati per la rivelazione di mutazioni frameshift.

I batteri di *S. typhimurium* hanno *base-pairs* GC, mentre i batteri di *E. coli* subiscono una reversione primaria nella coppia di basi AT ed identificano alcuni mutageni ossidanti, agenti cross-linking e idrazine.

I ceppi di *Salmonella typhimurium* hanno subito altre manipolazioni genetiche (**attraverso i marcatori genetici**), per essere ancora più sensibili alle mutazioni.

Quali sono i marcatori genetici:

1. **rfa**: mutazione che determina una maggior permeabilità della parete cellulare della parete batterica, rendendola più sensibile ai mutageni.
2. **uvrB/A**: elimina l'attività del sistema di riparazione per excisione e dà dipendenza alla biotina. E' una mutazione visibile con la luce ultravioletta ed è di colore blu.
3. **pkm101**: Plasmide che contiene un sistema di riparazione ricombinativa error-prone, oltre a conferire resistenza all'ampicillina (antibiotico che compromette la stabilità della parete cellulare batterica).
4. **pAQ1**: resistenza alla tetraciclina.

**IL FEGATO DI RATTO S9**, enzima epatico mima il metabolismo dei mammiferi e attiva metabolicamente i mutageni. E' utile quando ci troviamo davanti a sostanze che devono essere metabolizzate per vedere realmente se sono mutagene.

#### **DESCRIZIONE DEL TEST**

I batteri sono esposti a 6 concentrazioni di un campione da testare, assieme ad un controllo positivo e un controllo negativo, per 90 minuti (E.coli+S9: 20 minuti) in terreno contenente His (per Salmonella) o Trp (per E.coli), in modo da ottenere circa due divisioni cellulari.

Dopo l'esposizione, le colture vengono diluite con il terreno indicatore di pH privo di His o Trp e aliquotati nei primi 48 pozzetti della piastra da 384 pozzetti. Nel giro di due giorni, le cellule che hanno subito la reversione formeranno colonie. Il metabolismo dei batteri ridurrà il pH presente nel terreno e questa riduzione creerà il cambiamento del colore nei pozzetti. Questi pozzetti che hanno cambiato colore vengono contati e comparati con il controllo negativo (solvente). Ogni dose deve essere fatta in triplo per consentire l'analisi statistica dei dati.