

AMES TEST – Test genetico per l'analisi della genotossicità di una sostanza.

Ideato da Ames negli anni settanta, Il test di Ames costituisce un metodo di screening per gli agenti chimici per una possibile cancerogenicità.

Esso si basa sulla forte correlazione esistente tra mutagenicità e cancerogenicità.

L'agente chimico, se mutageno potrà determinare una mutazione (reversione) nel gene compromesso permettendo così al batterio di risintetizzare l'aminoacido essenziale.

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.

Nel dettaglio, il principio del test si basa sulla valutazione della capacità di un sospetto mutageno di provocare la reversione di un carattere [auxotrofo](#) his- in un ceppo di batteri mutato (*Salmonella typhimurium*), rendendolo nuovamente capace di sopravvivere in un terreno privo di [istidina](#). La maggior parte dei ceppi di Salmonella utilizzati nel test presentano anche altre mutazioni che alterano la permeabilità della parete (rfa- elimina la catena polisaccaridica dei lipopolisaccaridi di membrana), consentendo l'ingresso nel batterio di mutageni anche di grosse dimensioni, o eliminano l'azione dei meccanismi di riparo del DNA (Δ uvrB, delezione del gene uvrB), permettendo in tal modo il mantenimento delle mutazioni ottenute.

Poiché l'assenza di meccanismi di riparo rende complessa la crescita del batterio, in molti casi si introduce nel ceppo il plasmide pKM101, contenente i geni per il [sistema di riparo SOS](#) del DNA, incline a commettere errori durante la riparazione. Un'ulteriore mutazione presente in alcuni ceppi abitualmente utilizzati è la delezione di un gene coinvolto nella biosintesi della [biotina](#) (Δ bio), che

rende impossibile la sopravvivenza del batterio in terreni che ne siano privi; ciò consente di identificare eventuali contaminazioni del risultato finale sulla piastra (i batteri revertanti ottenuti dovranno risultare auxotrofi per la biotina).

I mutageni sono testati per valutare la mutazione inversa batterica utilizzando particolari specie batteriche mutanti quali:

- His-*S. typhimurium*
- Trp-*E. coli*

Per poter determinare mutazioni per:

- Sostituzioni base-pair (BP)
- Mutazioni frameshift (FS)

Il test così congegnato non permette però lo smascheramento dei procancerogeni in quanto, per esercitare la loro attività oncogena queste sostanze necessitano dell'attivazione metabolica che avviene all'interno di tessuti di organismi superiori. Per sopperire alla lacuna precedentemente descritta, il test di Ames è stato modificato, introducendo nel medium di coltura delle salmonelle "reporter" un estratto di enzimi microsomiali epatici, responsabili dell'attivazione di molti procancerogeni.

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.

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 **genotossicità** sui batteri (direttiva 67/548/CEE)
- analisi dei prodotti cosmetici
- dispositivi medici.

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 CON IL METODO DI FLUTTUAZIONE IN MICROTITER, prodotto da Xenometrix e distribuito dalla Biotoxik, è una modifica del classico Ames test in formato di piastra microtiter ed in un terreno liquido che presenta una validissima alternativa, in quanto, pur rimanendo fedele ai principi di Ames test classico, offre numerosi vantaggi, quali:

- **meno quantitativo di campione necessario**
- **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)
- **kit pronto all'uso**
- **segue le richieste della OECD 471** per l'analisi di sostanze chimiche

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.



BREVE DESCRIZIONE DEL PROCEDIMENTO:

I batteri sono esposti a 6 concentrazioni diverse di campione, così come il controllo positivo e quello negativo per 90 minuti in un terreno contenente sufficiente istidina (*S. typhimurium*) o triptofano (*E. coli*) per permettere approssimativamente due divisioni cellulari.

Dopo l'esposizione le culture (campione, controllo positivo e controllo negativo) sono diluite in un terreno privo di istidina o triptofano contenente un indicatore di pH e aliquotate in 48 pozzetti di una piastra a 384 pozzetti.

Entro 2 giorni le cellule che avranno subito la mutazione saranno cresciute. Il metabolismo batterico riduce il pH del terreno, causando un cambiamento del colore del terreno nei pozzetti con batteri mutati. Il numero di pozzetti contenenti colonie revertanti vengono contate per ogni diluizione e comparate con il solvente (controllo negativo). Ogni concentrazione è testata in triplicato per permettere un'analisi statistica dei dati.

Un incremento significativo e dose dipendente del numero di colonie revertanti dopo l'esposizione rispetto al controllo negativo indica la mutagenicità del campione.

La capacità mutagena del campione può essere testata anche in presenza di un attivatore metabolico, la frazione S9 di fegato di ratto, enzima epatico che 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.

Giorno 1:

- Preparazione della cultura overnight

Giorno 2:

- Determinazione del valore OD₆₀₀ della cultura overnight
- Preparazione e diluizione del campione
- Trasferimento del campione nelle piastre di esposizione
- Preparazione delle culture nel terreno di esposizione
- Aggiunta del terreno indicatore
- Trasferimento della cultura nel terreno di esposizione dalle piastre a 24 pozzetti a quelle da 384 pozzetti
- Incubazione delle piastre per la selezione delle colonie revertanti

Giorno 3:

- Incubazione delle piastre

Giorno 4:

- Lettura dei risultati
- Elaborazione statistica dei risultati

