

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.

I ceppi tester di Ames *S. typhimurium* ed *E. coli* sono stati utilizzati per più di 40 anni per rilevare composti mutageni. Vengono effettuate mutazioni puntiformi nell'istidina (*Salmonella typhimurium*) o nell'operone del triptofano (*Escherichia coli*), che rendono i batteri incapaci di produrre il corrispondente amminoacido. Queste mutazioni danno luogo a organismi his- o trp- che non possono crescere a meno che non vengano forniti istidina o triptofano.

Il potenziale mutageno di un campione viene valutato esponendo questi organismi che richiedono aminoacidi a concentrazioni variabili di campione e selezionando l'evento di reversione. Per selezionare l'evento di reversione vengono utilizzati terreni privi di istidina o triptofano che consentono solo a quelle cellule che hanno subito il ritorno alla prototrofia istidina / triptofano di sopravvivere e crescere.

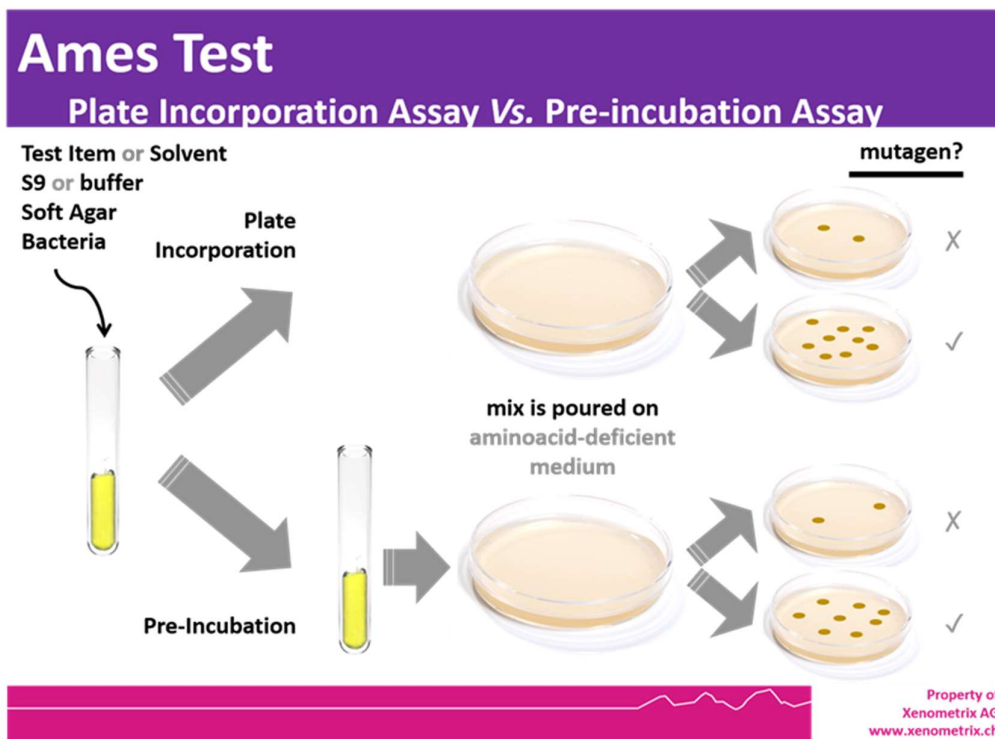
Un evento mutageno che causa sostituzioni di basi o mutazioni frameshift all'interno del gene può provocare un ritorno alla prototrofia degli aminoacidi. Questi batteri ripristinati cresceranno rispettivamente in terreni carenti di istidina o triptofano, mentre i batteri non ripristinati non saranno in grado di crescere. I terreni durante la fase di crescita possono essere liquidi o a base di agar.

TEST DI AMES SU PIASTRA DI AGAR OECD 471- Descrizione del test

I ceppi congelati appena scongelati vengono inoculati nel terreno di coltura e le colture vengono coltivate durante la notte a 37 ° C in uno agitatore di piastra in presenza (per TA98, TA100, E. coli WP2 [pKM101], E. coli WP2 uvrA [pKM101]) o assenza (per TA1535, TA1537, E. coli WP2 uvrA) di ampicillina. Le colture notturne vengono utilizzate la mattina successiva per il test di incorporazione o preincubazione di Ames.

I ceppi “tester” vengono esposti alla sostanza chimica per 20 minuti a 37 ° C prima di essere messi su piastre di agar con glucosio minimo. I componenti della miscela di preincubazione sono la miscela S9 o il tampone fosfato, la soluzione chimica in esame e la coltura batterica. Dopo 20 min a 37°C, alla miscela viene aggiunto il top agar fuso integrato con istidina / biotina o triptofano e mantenuto a 48°C.

Il contenuto viene miscelato e versato su piastre di agar con glucosio minimo. Dopo 48-72 ore a 37°C, il numero di colonie per piastra e per dose viene contato ad occhio e confrontato con il numero di colonie spontanee revertanti ottenute nelle piastre di controllo negativo.



Le linee guida relative al test di Ames sono OECD 471, ICH M7.

Anche se fino a poco tempo fa l'Ames test su piastra 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.

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.

Test di Ames miniaturizzato.

Diverse forme di Ames Test miniaturizzati

1. Ames Test miniaturizzato "Ames MPF™" basato sulla tecnologia della micropiastra liquida – 55 mg di campione per 5 ceppi, +/- S9. Newsletter A1 – Primi passi.
2. Ames Test miniaturizzato "MicroAmes24" sulla base di una piastra di agar da 24 pozzetti – 30 mg di campione per 5 ceppi, +/- S9
3. Ames Test Ultra-miniaturizzato "NanoAmes™" basato su piastre di agar da 25 pozzetti quadrati – 35 ug di campione per 5 ceppi, +/- S9
4. Ames Test Ultra-miniaturizzato "NanoAmes™ MPF" basato sulla tecnologia della micropiastra liquida *in produzione*.

1. AMES TEST MPF (Liquid Microplate Fluctuation) OECD 471, ICH M7

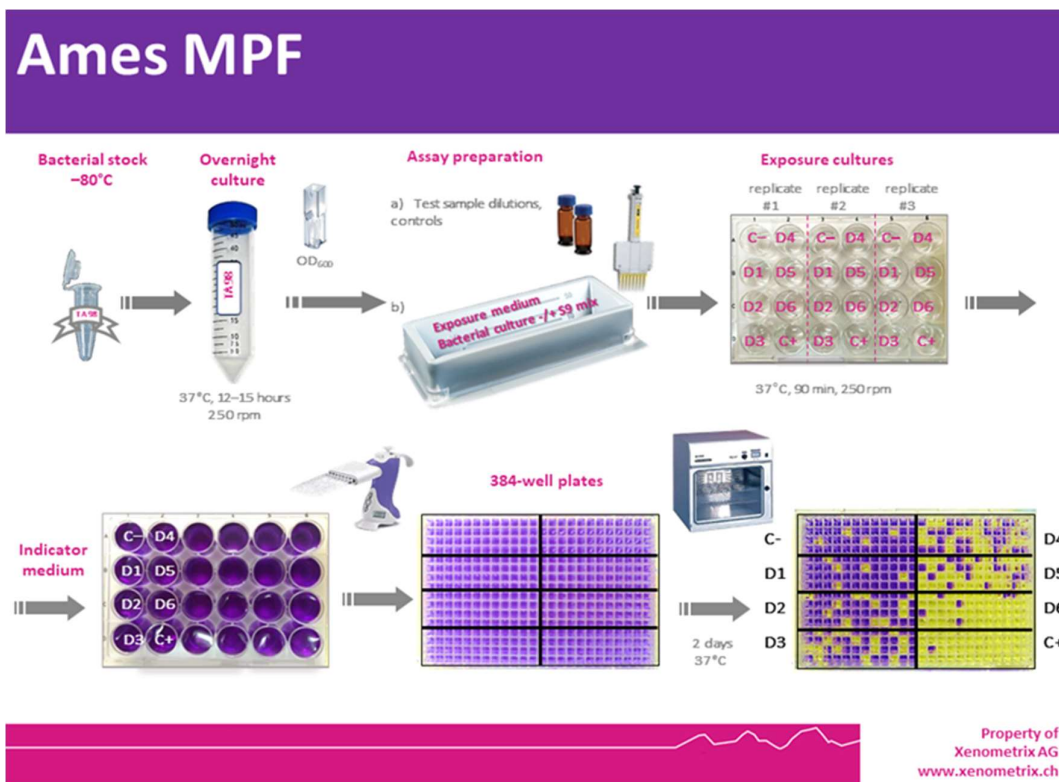
Descrizione del test

La crescita durante la notte è identica alla procedura descritta in precedenza (Test di Ames su piastre di agar - Descrizione del test).

I batteri vengono esposti a 6 concentrazioni di un campione da testare, nonché un controllo positivo e uno negativo, per 90 minuti in un terreno contenente una quantità sufficiente di istidina (*S. typhimurium*) o triptofano (*E. coli*) per supportare circa due divisioni cellulari. Dopo l'esposizione, le colture (controllo negativo, campioni e controlli positivi) vengono diluite in un terreno indicatore di pH privo di istidina o triptofano e aliquotate in 48 pozzetti di una piastra da 384 pozzetti.

Dopo due giorni, le cellule che hanno subito la reversione alla prototrofia degli amminoacidi cresceranno. Nei kit liquidi Ames II / Ames MPF, il metabolismo batterico riduce il pH del terreno, cambiando il colore dei pozzetti in cui si trovano i batteri. Il numero di pozzetti contenenti colonie revertanti viene contato per ciascuna dose e confrontato con un solvente (controllo negativo). Ogni dose viene testata in triplicato per consentire l'analisi statistica dei dati. Un aumento dose-dipendente e il significativo numero di colonie revertanti dopo l'esposizione del campione in esame rispetto ai controlli con solvente indica che il campione è mutageno.

Il potenziale mutageno dei campioni viene valutato direttamente e anche in presenza di attivazione metabolica, fornita da un omogenato di fegato, S9*.



Le linee guida relative al test di Ames sono OECD 471**, ICH M7.

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.

I DIVERSI TIPI DI AMES TEST MPF MINIATURIZZATI – OECD 471 ICH M7

Ames MPF™ Penta 1

Cod. C01-512-S1-P – Cod.C10-512-S1-P – Cod. C01-512-S2-P – Cod. C10-512-S2-P

5 x 48/480 punti di misurazione: 1/10 campione in 5 ceppi (TA98, TA100, TA1535, TA1537, E.coli uvrA/E.coli pkM101) se testato in 3 replicati, 6 diluizioni, +/- fegato di ratto S9 aroclor 1254 o PB/β-Naphtoflavone-indotto, Controlli negativi e positivi. Non inclusi nel kit: soluzioni di cofattore S9, micropiastre

Ames MPF™ Penta 2

Cod. B01-512-S1-P – Cod.B10-512-S1-P – Cod. B01-512-S2-P – Cod. B10-512-S2-P

5 x 48/480 punti di misurazione: 1/10 campione in 5 ceppi (TA98, TA100, TA1535, TA1537, E.coli WP2 uvrA[pKM101]) se testato in 3 replicati, 6 diluizioni, +/- fegato di ratto S9 aroclor 1254 o PB/β-Naphtoflavone-indotto, Controlli negativi e positivi. Non inclusi nel kit: soluzioni di cofattore S9, micropiastre

Per lo screening – ICH M7

Ames MPF™ 98/100

Cod. A01-210-S1-P – Cod.A10-210-S1-P - Cod. A01-210-S2-P – Cod.A10-210-S2-P

1/10 campione in 2 ceppi (TA98, TA100), se testato in 3 replicati, 6 diluizioni, +/- fegato di ratto S9 aroclor 1254 o PB/β-Naphtoflavone-indotto, Controlli negativi e positivi. Non inclusi nel kit: soluzioni di cofattore S9, micropiastre



Nei prossimi numeri descriveremo gli altre forme di test di Ames miniaturizzati

Leggenda:

***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

**** OECD 471 ed AMES MPF:**

Almeno 5 Ceppi Batterici:

TA98 +/- S9, TA100 +/- S9, TA1537 or TA97 or TA97a +/- S9, TA1535 +/- S9, TA102 o 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 diluizioni.