

Ames-fluctuatietest geschikt alternatief voor omslachtige en dure plaatstest

In het bedrijfstakonderzoek van de gezamenlijke drinkwaterbedrijven introduceerde KWR Watercycle Research Institute onlangs de Ames-fluctuatietest. Het is een alternatieve versie van de klassieke Ames-plaatstest, die wereldwijd de bekendste mutageniteitstest is en al 30 jaar door KWR gebruikt wordt in studies voor de drinkwaterbedrijven. De nieuwe testvorm is, mede in het bedrijfstakonderzoek, de afgelopen jaren internationaal gestandaardiseerd en verfijnd. Eind vorig jaar is een eerste bijeenkomst gehouden over de toepassing van deze testvorm, waarna internationale partijen dit jaar en de komende jaren meer mogelijkheden tot optimalisatie gaan onderzoeken.

De Ames-fluctuatietest wordt toegepast om water te controleren op de aanwezigheid van mutagene (of genotoxische) stoffen. Deze stoffen veroorzaken mutaties - blijvende en overerfbare veranderingen in het DNA - die kunnen leiden tot ziektes, zoals kanker. Deze stoffen kunnen ook met chemisch analytische technieken worden aangetoond, zoals LC-UV of LC-MS, maar daarmee worden alleen de bekende mutagene verbindingen gedetecteerd. Een ander manier is om gebruik te maken van in vitro genotoxiciteitstesten. Daarin worden specifieke cellen blootgesteld aan een geconcentreerd watermonster,

waarna de hoeveelheid DNA-mutaties in de cellen wordt gemeten. Hiermee wordt het totale effect van alle mutagene stoffen samen in het waterextract bekend. In Nederlands drinkwater kunnen hooguit heel lage concentraties van stoffen voorkomen. Omdat mutageniteit echter al bij lage concentraties kan optreden, is het toch relevant om dit effect in drinkwater te meten.

De Ames-fluctuatietest gebruikt bepaalde stammen *Salmonella typhimurium*-bacteriën, die niet kunnen groeien zonder histidine, maar door specifieke mutaties door mutagene stoffen juist wel weer kunnen

groeien zonder histidine. De mate van inductie van deze mutaties is een maat voor de genotoxiciteit van het watermonster. In de Ames-fluctuatietest is dit te zien aan de gele kleur die de bron met deze bacteriën dan krijgt.

Het voordeel van de fluctuatietest is dat er minder waterextract voor nodig is dan voor de klassieke plaatstest. Dit bespaart kosten. Bovendien kunnen meer monsters gelijktijdig worden opgewerkt en wordt het mogelijk kleine volumes water uit zuiveringsopstellingen in de laboratoria te testen. Omdat deze versie van de test echter andere

Deelnemers aan de bijeenkomst over de Ames-fluctuatietest, v.l.n.r.: Merijn Schriks (KWR), Jan van Benthem (RIVM), Paul Baggelaar (Icastat), Philippe Vanparys (Altoxon, België), Georg Reifferscheid (BfG, Duitsland), Mirjam Luijten (RIVM), Jacky van Gompel (Janssen Pharmaceutica, België), Sini Flückiger-Isler (Xenometrix, Zwitserland), David Kirkland (Kirkland Consulting, Verenigd Koninkrijk), Minne Heringa (KWR), Henk Ketelaars (Evides) en Bram Martijn (PWN).



getallen oplevert dan de Ames-plaattest, wilden KWR en de drinkwaterbedrijven samen met internationale experts vaststellen of de fluctuatietest geschikt is om de plaattest te vervangen. Hiertoe werd afgelopen november samen met het RIVM een werkbijeenkomst gehouden, waar ook meer uitleg over de tests werd gegeven. Tijdens die bijeenkomst heeft een kleine, besloten groep met internationale deskundigen, onder leiding van dr. David Kirkland (adviseur), presentaties van enkele gebruikers van de Ames-fluctuatietest aangehoord en zich gebogen over een lange lijst met vragen van de drinkwaterbedrijven. Belangrijke onderwerpen die besproken werden, waren de gevonden overeenkomsten tussen de klassieke test en de fluctuatietest bij dezelfde stoffen, de acceptabele intra-labvariaties en de goede resultaten van het ringonderzoek dat onderdeel was van de ISO-standaardisatie van de test.

Conclusies

- Hoewel de naam Ames II vaak gehanteerd wordt, is het beter te spreken over de Ames-fluctuatietest, omdat de naam Ames II gereserveerd is voor een gepatenteerde Ames-fluctuatietest met alleen de bacteriestammen TA98 en TAMix;
- De Ames-fluctuatietest en de klassieke Ames-plaattest zijn uitwisselbaar. Beide versies van de test zijn geschikt voor genotoxiciteitsmetingen;
- Op dit moment zijn er twee statistische evaluatiemethoden, waaronder die van KWR, die beide geschikt zijn om te bepalen of een monster genotoxisch is of niet;
- Net zoals voor de Ames-plaattest is het ook voor de Ames-fluctuatietest beter de test niet alleen met de bacteriestammen TA98 en TA100 uit te voeren, zoals tot nu toe gebruikelijk was, maar met de vijf stammen, zoals beschreven in de OECD-richtlijn voor de Ames-test. Op die manier kunnen alle mogelijke mutagene stoffen worden opgespoord. Als naast de Ames-test ook een test voor chromosoom-aberraties wordt uitgevoerd, kan met minder additionele stammen worden volstaan (TA97, TA98, TA100);
- Nader onderzoek is nodig naar het effect van de achtergrondwaarden van de

Ames-fluctuatietest op de detectie van genotoxische activiteit bij lage concentraties. Sommige experts verwachten dat bij hogere achtergrondwaarden dan nu de gevoeligheid toeneemt. Andere experts, onder wie van KWR en statisticus Paul Baggelaar (Icastat), hebben daar hun twijfels over, maar alleen metingen kunnen hier uitsluitsel over geven;

- Indien de achtergrondwaarden gelijk aan nul zijn, is de test niet acceptabel en moet deze herhaald worden tot een achtergrond > 0 verkregen wordt;
- Een onafhankelijke herhaling van een test op hetzelfde waterextract is vereist om voldoende zekerheid over het resultaat te verkrijgen.

Een belangrijke vraag is hoe de resultaten van de fluctuatietest te vergelijken zijn met die van de klassieke plaattest. Volgens David Kirkland zijn de testen niet kwantitatief te vergelijken, omdat de klassieke test in een vast medium (een gel van agar) wordt uitgevoerd en de fluctuatietest in vloeibaar medium. Hierdoor is de beweging van de chemische stoffen door het medium, en daarmee de kans op het veroorzaken van DNA-schade, bij beide testmethoden fundamenteel verschillend. De Ames-fluctuatietest is om deze reden waarschijnlijk gevoeliger dan de Ames-plaattest.

Volgens Jan van Benthem (RIVM) zijn uit de uitkomsten van genotoxiciteitstesten geen directe gezondheidsrisico's af te leiden. Stoffen kunnen na opdrinken, voor zij de cellen bereiken, tegengehouden worden door de darmwand, omgezet worden in onschadelijke stoffen in de lever, snel uitgescheiden worden door de nieren, opgeslagen worden in vet, etc. Dit soort processen wordt niet meegenomen met in vitro testen als de Ames-fluctuatietest. Een positieve uitkomst in deze test is daarom alleen een signalering van een mogelijke bedreiging. Het is wel een signalering die serieus genomen dient te worden, omdat de Ames-fluctuatietest een relatief laag percentage vals positieven kent.

Als een positieve respons in het reine water wordt gevonden, is het zaak eerst te kijken of de genotoxische activiteit eenvoudig verwijderd kan worden uit het water. Is dit onmogelijk, te lastig of te duur, dan is het nodig de veroorzakende stof te identificeren

om een echte risicobeoordeling voor de gezondheid te kunnen geven.

De conclusie luidt dat met vertrouwen gebruik kan worden gemaakt van de Ames-fluctuatietest in de analyse van de chemische waterkwaliteit. Momenteel wordt door experts, die deelnamen aan de bijeenkomst eind vorig jaar bekeken hoe de test verder verbeterd kan worden door onderzoek naar de sturing van de hoogte van de achtergrond.

Minne Heringa (KWR Watercycle Research Institute)
Mirjam Luijten en Jan van Benthem (RIVM)

Website

Iedere werkdag kunt u op www.vakbladh2o.nl het laatste nieuws uit de waterwereld lezen. U hoeft zich sinds begin dit jaar niet meer te registreren om de volledige berichten te kunnen lezen. Op de internetpagina staat bovendien een overzicht van de belangrijkste informatie uit het laatst verschenen nummer van de papieren H₂O.

Abonnees van H₂O kunnen op internet het archief raadplegen. Daarin staan alle artikelen die in het tijdschrift verschenen sinds 1998. Van de artikelen die vanaf september 2006 werden gepubliceerd, zijn pdf-bestanden beschikbaar.