

# Applicazione del sistema di deantigenizzazione enzimatica sulla riduzione di elementi batterici da tessuti ossei umani

## Application of the enzymatic deantigenation system in the reduction of the bacterial elements in human bone tissue

N.A. Carlone\*, V. Tullio\*, N. Mandras\*, J. Roana\*, S. Maggi\*

\*Università di Torino, Dipartimento di Sanità pubblica e Microbiologia

\*Bioteck Srl, Arcugnano (Vicenza), Italia

### Riassunto

Le banche europee dei tessuti prelevano, processano e conservano i tessuti ossei seguendo protocolli operativi rigorosi. Tuttavia essi potrebbero non garantire la completa sterilità dei reperti ossei soprattutto quando questi siano immagazzinati per lunghi periodi. Bioteck S.r.l. ha realizzato un processo di deantigenazione enzimatica che può essere applicato a tessuto osseo proveniente da qualunque specie di mammifero, uomo compreso. In questo lavoro, il processo U.B.T.T. (Universal Bone Tissue Treatment) di Bioteck è stato testato su 30 campioni di teste femorali di provenienza umana, inoculati con concentrazioni elevate di tre delle specie batteriche più comunemente causa d'infezione negli interventi di chirurgia ossea: *S. aureus*, *B. cereus* ed *E. coli*. La carica batterica rimanente è stata testata attraverso il metodo bioburden. I risultati mostrano che il processo di deantigenizzazione enzimatica Bioteck elimina completamente la contaminazione batterica dai campioni.

*Parole chiave:* alloinnesti, deantigenizzazione enzimatica

### Introduzione

BIOTECK S.r.l. viene fondata nel 1995 allo scopo di applicare innovative processi di deantigenizzazione a tessuti ossei umani. Il trasferimento di tessuto osseo tra specie geneticamente diverse, richiede elaborate tecniche biologiche, tali da separare in maniera

### Abstract

Bone tissue banks withdraw, process and preserve bone tissues according to strict operating protocols. Nonetheless, they could not guarantee the complete sterility of the treated bone samples, above all if they are stored for a long period of time. Bioteck S.r.l. has devised an enzymatic deantigenation process that can be applied to bone deriving from all mammal species, comprising humans. In this work, the Bioteck U.B.T.T. (Universal Bone Tissue Treatment) process has been tested on 30 human femoral head samples, inoculated with high concentrations of three of the most common bacterial species responsible of infection in bone surgery sites: *S. aureus*, *B. cereus* and *E. coli*. The residual bacterial load was tested through the bioburden method. Results show that the Bioteck process completely eliminates all bacterial contamination from the samples.

*Key words:* allografts, enzymatic deantigenation

### Introduction

BIOTECK S.r.l. was established in 1995 in order to apply innovative deantigenation processes to human bone tissues. The transfer of bone tissue between two different species requires elaborated biological techniques in order to separate



assoluta la componente organica da quella minerale. Il processo di deantigenizzazione enzimatica BIOTECK si basa su una miscela di enzimi tipizzata al fine di asportare selettivamente i residui organici che possano innescare la reazione del sistema immunitario. Il sistema agendo a 37°C non induce nessuna trasformazione nell'apatite ossea, consentendo alla parte minerale di essere metabolizzate tramite via osteoclastica. Modificando opportunamente la miscela di enzimi, il sistema può essere applicato a tutte le specie di mammiferi esistenti, compreso l'uomo. Nel 2003 viene aperta, presso la sede operativa BIOTECK, la sezione U.B.T.T. (Universal Bone Tissue Treatment), il cui scopo è applicare le tecniche di deantigenizzazione ai tessuti ossei umani provenienti da donatori. Il servizio si rivolge alle banche europee dei tessuti; tuttavia, anche se queste ultime lavorano seguendo rigidi protocolli di prelievo e conservazione non è del tutto possibile garantire l'assoluta sterilità dei reperti ossei trattati, soprattutto quando questi siano immagazzinati per lunghi periodi. Lo scopo del presente lavoro è stato valutare quanto il sistema di deantigenizzazione fosse in grado di agire su ceppi batterici eventualmente presenti nei prelievi, considerando questi come residui organici e, quindi, inserendoli come elemento da eliminare in fase di deantigenizzazione

### Materiali e metodi

Sono stati saggiati 30 campioni di teste femorali umane di 5mm di diametro trattate con una soluzione antibiotica ad ampio spettro e poi congelate. Dopo il processo di scongelamento, i campioni sono stati inseriti in una capsula Petri da 60 mm e sottoposti ad un ciclo di 4-5 lavaggi con 10 ml di soluzione fisiologica allo 0.85% NaCl. L'intervallo tra un lavaggio ed il successivo è stato di circa un'ora. Parallelamente, a partire da una coltura batterica di 24 ore su terreno solido, sono state allestite delle brodocolture in Brain Heart Infusion (Merck KgaA Darmstadt, Germania) di ceppi certificati, quali *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 35218 e *Bacillus cereus* ATCC 9241. Le colture batteriche sono state incubate a 37°C in aerobiosi per 24 ore al fine di ottenere una concentrazione batterica iniziale pari a  $10^7$ - $10^9$  ufc/ml ( $T_0$ ). Al termine del ciclo di lavaggi in fisiologica, tutti i campioni sono stati inoculati con 250 µl delle diverse sospensioni batteriche ed incubati in termostato a 37°C in aerobiosi per 24 ore. In parallelo, è stato allestito un controllo di crescita ( $P_c$ ) per ogni microorganismo utilizzato contenente esclusiva-

completamente la componente organica dalla minerale. The BIOTECK enzymatic deantigenation process is based upon an enzyme mixture, whose components have been chosen in order to eliminate selectively the organic residues that can trigger the immune response. The process, since it works at 37°C, does not modify the bone apatite, allowing for the metabolization of the mineral component by osteoclasts.

By modifying properly the enzyme mixture, the system can be applied to all mammal species, comprising the human one.

The U.B.T.T. (Universal Bone Tissue Treatment) section started to operate in the BIOTECK Production Facility in 2003. Its purpose is to apply the deantigenation techniques to human bone tissues coming from donors. This service is offered to the European tissue banks. Anyway, even if they work according strict withdrawal and preservation protocols, they do not guarantee the complete sterility of the treated bone samples, above all if they are stored for a long period of time.

The purpose of this work is to assess if the deantigenation system is able to act on bacterial stocks possibly present in the samples, considering them as organic residues and therefore including them as an element to be eliminated through the deantigenation process.

### Material and methods

30 human femoral heads, 5 mm diameter, were treated with a broad-spectrum antibiotic solution and then frozen. After being unfrozen, the samples were placed in a 60 mm petri dish and were washed 4-5 times with 10 ml physiological solution (NaCl 0.85%). Time between two successive washings was approximately one hour.

At the same time, some liquid cultures of certified bacterial stocks (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 35218, and *Bacillus cereus* ATCC 9241) in Brain Heart Infusion (Merck KgaA Darmstadt, Germany) were prepared starting from 24 hrs cultures on solid medium. Bacteria were cultured for 24 hours at 37°C in aerobic conditions in order to reach an initial concentration equal to  $10^7$ - $10^9$  cfu/ml ( $T_0$ ). After the washings with physiological solution, all the 30 samples were inoculated with 250 µl of the different bacterial cultures and they were incubated at 37°C in aerobic



mente 5 ml di brodocoltura.

Al termine dell'incubazione, due campioni per ogni microrganismo (Po) sono stati sottoposti ad una fase di lavaggio con 10 ml di soluzione fisiologica. Quindi è stata effettuata una valutazione della carica batterica contenuta nel liquido di risciacquo tramite il metodo delle diluizioni al raddoppio, cui è seguito quello della conta in piastra su Nutrient Agar (Merck). Il numero di batteri che hanno attecchito sul campione è stato espresso come ufc (unità formanti colonie)/ml (metodo Bioburden). Si è proceduto allo stesso modo per valutare la concentrazione dei microrganismi presenti nei campioni Pc. I campioni d'osso rimasti (Pd) sono stati sottoposti al processo di deantigenizzazione consistente nell'estrazione di proteine e lipidi.

Al termine della deantigenizzazione, ogni campione Pd è stato diviso in due porzioni: la prima è stata sottoposta al lavaggio ed il liquido di risciacquo è stato valutato tramite il metodo Bioburden, mentre la seconda è stata irraggiata a 25 KGray beta.

Alla fine della sterilizzazione, il prodotto è stato analizzato secondo la tecnica del Bioburden.

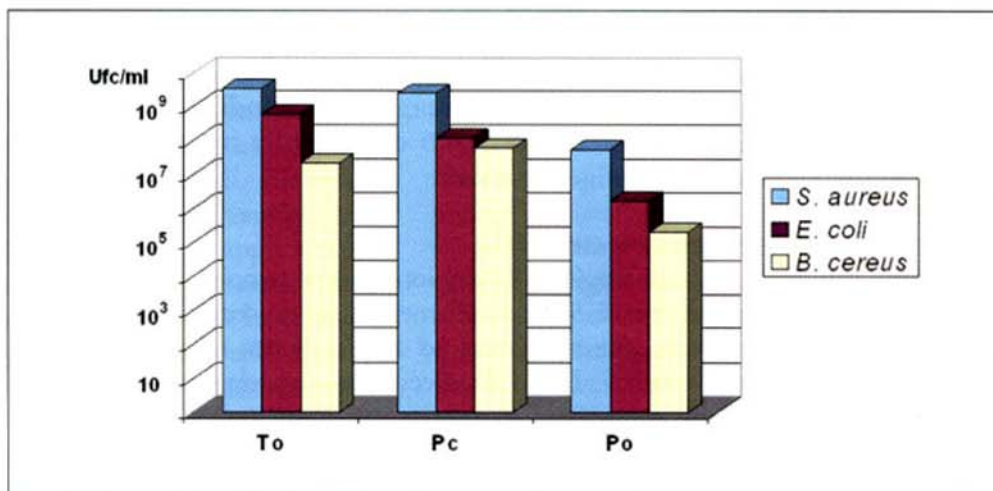
conditions for 24 hours. At the same time a growth control (Pc) for each bacterial species was prepared in 5 ml of liquid culture medium.

After incubation two samples for each bacterial stock (Po) were washed with physiological solution. Then the bacterial load was assessed in the wash out liquid through multiple double dilutions and cell count on Nutrient Agar (Merck). The number of bacterial on the sample was expressed as cfu (colony forming units)/ml (Bioburden method). The same procedure was used to determine the bacterial concentration on the Pc samples. The remaining bone samples (Pd) underwent enzymatic deantigenation to extract lipids and proteins.

After deantigenation, each Pd sample was divided in two parts: the first was washed and the liquid analyzed with the Bioburden method, while the second was irradiated with 25 KGray beta rays. After sterilization the product was analyzed with the Bioburden method.

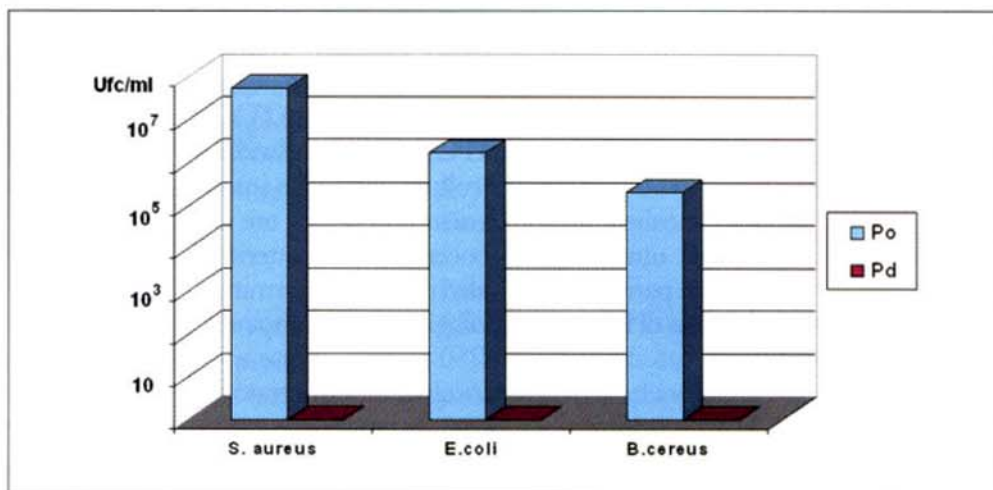
**Fig. 1: Concentrazione batterica iniziale (To), carica batterica presente nelle colture di controllo (Pc) e concentrazione batterica presente sui campioni dopo incubazione per 24 ore. La concentrazione batterica sui campioni dopo incubazione è minore circa 102 volte inferiore a quella inizialmente inoculata**

Fig. 1: Initial bacterial concentration (To), bacterial load in the growth cultures (Pc) and bacterial concentration on the samples after 24 hrs. incubation. The bacterial concentration on the samples after incubation is approximately 102 times smaller than the one initially inoculated



**Fig. 2: Concentrazione batterica presente sui campioni prima (Po) e dopo (Pd) il processo di deantigenazione enzimatica Bioteck. Il trattamento Bioteck annulla la carica batterica presente sul campione**

Fig. 2: Bacterial concentration on the samples before (Po) and after (Pd) the enzymatic Bioteck deantigenation treatment. The Bioteck process eliminates the bacterial load of the sample





## Risultati

La carica batterica che ha attecchito sul campione d'osso dopo un periodo di 24 ore di incubazione a 37°C (Po) è risultata rispettivamente, di  $2,09 \times 10^5$  ufc/ml per *B. cereus*, di  $1,70 \times 10^6$  ufc/ml per *E. coli* e di  $5,52 \times 10^7$  ufc/ml per *S. aureus*, rispetto al campione di controllo di crescita (Pc) che, invece, è risultato di  $6,15 \times 10^7$  ufc/ml per *B. cereus*, di  $1,16 \times 10^8$  ufc/ml per *E. coli* e di  $2,53 \times 10^9$  ufc/ml per *S. aureus* (Fig. 1).

Si evidenzia che sia rispetto al controllo (Pc), dove i microrganismi si trovano in un ambiente ideale di crescita, sia rispetto alla carica batterica iniziale (To), la carica batterica che aderisce all'osso (Po) è risultata minore di un fattore pari a  $10^2$ , mantenendosi comunque a valori di  $10^7$  per *S. aureus*,  $10^6$  per *E. coli* e  $10^5$  per *B. cereus*, che rientrano in quelli di una carica potenzialmente infettiva.

Nella Fig. 2 è riportata la carica batterica dopo il processo di deantigenizzazione. Si può notare che in seguito a questo processo, il numero di microrganismi presenti sull'osso dopo l'attecchimento, si è ridotto drasticamente sino ad un abbattimento totale della carica batterica per tutti e tre i microrganismi saggiati. Si sottolinea, inoltre, che l'assenza di crescita microbica si mantiene anche dopo il processo di irraggiamento a 25 KGray beta (dati non mostrati).

## Conclusioni

I risultati ottenuti indicano che il processo di deantigenizzazione impedisce la replicazione batterica sul tessuto osseo.

La spiegazione a questo evento potrebbe risiedere nel fine ultimo di questo processo ovvero quello di eliminare la componente organica (proteine e lipidi) dal campione stesso. Infatti, la matrice organica risulta essere la fonte nutritiva per i microrganismi e, venendo a mancare, impedisce la loro replicazione.

L'ulteriore impiego del processo di sterilizzazione mediante irraggiamento a 25 KGray beta può essere utile per eliminare eventuali contaminazioni che avvengono durante la lavorazione del campione. Alla luce di queste considerazioni, il processo di deantigenizzazione può essere considerato un metodo d'avanguardia nell'ambito del proprio settore d'azione

## Results

The bacterial load present on a bone sample after 24 h. incubation at 37°C, Po, was respectively equal to  $2.09 \times 10^5$  cfu/ml for *B. cereus*,  $1.70 \times 10^6$  cfu/ml for *E. coli* and  $5.52 \times 10^7$  cfu/ml for *S. aureus*, while the growth controls were respectively  $6.15 \times 10^7$  cfu/ml for *B. cereus*,  $1.16 \times 10^8$  cfu/ml for *E. coli* and  $2.53 \times 10^9$  cfu/ml for *S. aureus* (Fig. 1). The bacterial load adhering to bone (Po) is decreased by a  $10^2$  factor, with respect to both the initial bacterial load (To) and the control (Pc) where the microorganisms are in an ideal growth environment, but it is still in the range  $10^7$  for *S. aureus*,  $10^6$  for *E. coli* and  $10^5$  for *B. cereus*, which are potentially infective loads.

The bacterial load after the deantigenation process is shown in Fig. 2. It can be noticed that, after this process, the number of microorganisms on the bone samples has decreased dramatically up to the total elimination of the bacterial load for all the three tested microorganisms. We underline, moreover, that the absence of microbial growth maintains also after 25 KGray beta irradiation.

## Conclusions

Our results show that the deantigenation process inhibits completely the bacterial replication on the bone tissue. Our explanation of this event could be the final purpose of this process itself, that is to say, to eliminate completely the organic component (lipids and proteins) from the sample. In fact, the organic matrix is the source of nutrients for microorganisms, and when it lacks this inhibits their replication.

The further sterilization process through 25 KGray beta rays may be useful to eliminate contaminations occurring during the following phases of treatment of the sample. According to our results, the Bioteck enzymatic deantigenation process is an avant-garde method in the field.