
REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

Aderența bacteriană și formarea biofilmului bacterian pe suprafața implanturilor dentare

Doctorand: **Simina Angela Lăcrimioara IUȘAN**

Conducător de doctorat: **Prof. Dr. Silviu ALBU**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

INTRODUCERE	1
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	5
1. Generalități despre implanturile dentare	7
1.1. Principalele tipuri de implanturi dentare.....	7
1.2. Indicațiile, contraindicațiile, avantajele și dezavantajele implanturilor dentare	8
1.3. Materialele din care sunt confecționate implanturile dentare ...	10
2. Patologii peri-implantare de natură infecțioasă	13
2.1. Anatomia țesuturilor peri-implantare	13
2.2. Mucozita peri-implantară	14
2.3. Peri-implantita	15
3. Microbiomul oral	21
3.1. Introducere	21
3.2. Biogeografia microbiomului cavității orale.....	22
3.3. Principalele componente ale microbiomului oral	23
3.3.1. Virusuri	24
3.3.2. Archaea	25
3.3.3. Fungi	25
3.3.4. Paraziți	26
3.3.5. Bacterii.....	27
3.4. Specii bacteriene întâlnite în țesuturile sănătoase peri-implantare.	28
3.5. Specii bacteriene întâlnite în mucozita peri-implantară	29

3.6. Specii bacteriene întâlnite în peri-implantită.....	31
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ.....	35
4. Scop și obiective	37
5. Studiul 1. Principalele comunități bacteriene identificate la nivelul situsurilor afectate de peri-implantită: o revizuire sistematică.....	39
5.1. Introducere.....	39
5.2. Obiective.....	41
5.3. Material și metodă	42
5.3.1 Strategia de căutare.....	42
5.3.2. Criterii de includere și excludere.....	42
5.3.3 Selecția studiilor și colectarea datelor	43
5.4. Rezultate	48
5.4.1. Documentarea bibliografică și selecția articolelor	48
5.4.2 Caracteristicile clinice și microbiologice ale studiilor incluse	49
5.5. Discuții.....	52
5.6. Concluzii.....	54
6. Studiul 2. Corelații între Patologiile Infecțioase ale Implanturilor Dentare și Sinuzita Maxilară	55
6.1. Introducere.....	55
6.1.1. Implanturile dentare și evaluarea osului	55
6.1.2. Tehnici de augmentare osoasă.....	55
6.1.3. Complicațiile sinusale ale intervențiilor chirurgicale pentru augmentarea osoasă și plasarea implanturilor	55

6.2. Material și metodă	56
6.2.1. Strategia de cercetare.....	56
6.2.2. Criterii de includere și excludere.....	57
6.2.3. Selecția studiilor și colectarea datelor	57
6.2.4. Evaluarea riscului de bias (Calitatea metodologică)	58
6.3. Rezultate	59
6.3.1. Caracteristicile studiilor.....	59
6.3.2. Corelația dintre patologii.....	61
6.3.2.1. Peri-implantita, elevarea sinusului cu augmentare osoasă și sinuzita cronică sau acută	61
6.3.2.2. Peri-implantita, sinuzita și abcesul cerebral	62
6.3.2.3. Peri-implantita și comunicările oro-antrale	63
6.3.2.4. Migrarea implanturilor/Extrudarea grefei osoase în sinusul maxilar și sinuzita	63
6.3.2.5. Implanturi zigomatice și sinuzita.....	64
6.3.3. Extrapolarea rezultatului.....	64
6.4. Discuții.....	64
6.5. Concluzii.....	67
7. Studiul 3. Explorarea factorilor de risc ai peri-implantitei : un studiu transversal.....	69
7.1. Introducere.....	69
7.2 Material și metodă	70
7.2.1. Eșantionul studiului	70

7.2.2. Criterii de eligibilitate.....	71
7.2.3. Definirea cazurilor.....	71
7.2.4. Rezultate urmărite.....	71
7.2.5. Colectarea datelor.....	72
7.2.5.1. Fișe medicale.....	72
7.2.5.2. Examen clinic.....	72
7.2.6. Colectarea și examinarea probelor microbiologice.....	72
7.2.7. Reproducibilitate și repetabilitate.....	73
7.2.8. Analiza statistică.....	74
7.2.9. Evaluarea riscului de bias.....	74
7.3 Rezultate.....	74
7.3.1. Populația studiului.....	74
7.3.2. Rezultate clinice.....	75
7.3.2.1. Distribuția pe genuri.....	76
7.3.2.2. Grupe de vârstă.....	77
7.3.2.3. Distribuția fumători/nefumători.....	78
7.3.2.4. Distribuția Maxilar/Mandibulă.....	79
7.3.2.5. Etapa de tratament și tipul protezării.....	81
7.3.3. Rezultate microbiologice.....	83
7.4. Discuții.....	86
7.4.1. Constatări principale— Consistențe și discrepanțe față de rezultate anterioare.....	86

7.4.2. Limitările cercetării	92
7.5. Concluzii.....	93
8. Studiul 4. Aderența bacteriană și formarea biofilmului bacterian pe suprafața implanturilor dentare- studiu <i>in vitro</i>	95
8.1 Introducere.....	95
8.2 Material și metodă	96
8.2.1 Material.....	96
8.2.2 Pregătirea discurilor.....	98
8.2.3 Pregătirea celulelor	98
8.2.3.1. Recoltarea foliculului dentar	99
8.2.3.2. Cultura primară a celulelor izolate din foliculul dentar.....	99
8.2.3.3. Protocolul de subcultivare	100
8.2.3.4. Stocarea pe termen scurt și lung a celulelor MSC.....	100
8.2.3.5. Protocolul de dezghețare a celulelor.....	100
8.2.3.6. Caracterizarea celulelor izolate	101
8.2.3.7. Protocol de marcarea imunocitochimică	101
8.2.3.8. Protocol de marcarea celulelor stem pentru analiza prin citometrie în flux	102
8.2.3.9. Diferențierea osteogenică	102
8.2.4 Tatonarea cultivării celulelor MSC din foliculul dentar pe discuri de titan	105
8.2.5 Experimentele de co-cultivare a celulelor MSC din FD pre-diferențiate osteogenic și bacterii	107

8.2.6 Evaluarea biofilmului	110
8.2.7 Analiza statistică.....	110
8.3 Rezultate	111
8.3.1 Evaluarea aderenței celulelor pre-diferențiate din folicul dentar pe cele trei tipuri de suprafețe de titan	111
8.3.2 Evaluarea aderenței <i>Enterococcus faecalis</i> și <i>Streptococcus oralis</i> , pe cele trei tipuri de suprafețe de titan.....	112
8.3.3 Evaluarea Modelelor A,B,C de co-cultură cu celule pre-diferențiate din FD + bacterii.....	113
8.3.4 Evaluarea biofilmului format pe cele 3 suprafețe.....	121
8.4 Discuții.....	121
8.4.1 Constatări principale—Consistențe și discrepanțe față de rezultate anterioare	121
8.4.2 Limitările cercetării	127
8.5 Concluzii.....	127
9. Concluzii generale	129
10. Originalitatea și contribuțiile inovative ale cercetării doctorale .	131
REFERINȚE.....	132

Cuvinte cheie: aderență bacteriană, biofilm bacterian, implant dentar, osteoblaști, osteointegrare, peri-implantită, suprafețe nanostructurate, titan.

LISTA DE PUBLICAȚII

Articole publicate *in extenso* ca rezultat al cercetării doctorale

1. Iușan SAL, Lucaciu OP, Petrescu NB, Mirică IC, Toc D-A, Albu S, Costache C. The Main Bacterial Communities Identified in the Sites Affected by Periimplantitis: A Systematic Review. *Microorganisms*. 2022; 10(6):1232. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061232>. *ISI Factor de impact JCR_{2022-4,5}, Q2 (studiu cuprins în capitolul 5)*
2. Iușan SAL, Costache C, Lucaciu OP, Petrescu B-N, Mirică IC, Toc D-A, Albu S. Correlations between Dental Implant Infectious Pathologies and Maxillary Sinusitis: A Review Article. *Journal of Clinical Medicine*. 2023; 12(15):5059. <https://doi.org/10.3390/jcm12155059>. *ISI Factor de impact JCR₂₀₂₃₋₃, Q1(studiu cuprins în capitolul 6).*
3. Iușan SAL, Lucaciu OP, Petrescu NB, Mirică IC, Toc D-A, Albu S, Costache C. Exploring Peri-Implantitis Risk-Factors: A Cross-Sectional Study. *Dentistry Journal*. 2025; 13(4):148. <https://doi.org/10.3390/dj13040148>. *ISI Factor de impact JCR_{2024-3,1}, Q1(studiu cuprins în capitolul 7).*

INTRODUCERE

Menținerea sănătății peri-implantare reprezintă o provocare majoră în implantologia dentară modernă, având în vedere incidența tot mai mare a infecțiilor asociate implanturilor și impactul acestora asupra stabilității osoase pe termen lung. Colonizarea bacteriană și formarea biofilmului la nivelul suprafețelor implantare pot compromite procesul de osteointegrare și pot conduce la apariția peri-implantitei, una dintre principalele cauze ale eșecului tratamentelor implantare. În acest context, analiza compoziției microbiotei peri-implantare și a interacțiunilor dintre bacterii și suprafața implantului contribuie la o mai bună înțelegere a mecanismelor implicate în succesul sau eșecul osteointegrării și la dezvoltarea strategiilor de prevenire a infecțiilor peri-implantare.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

În ultimele decenii, implantologia dentară a cunoscut o dezvoltare semnificativă, devenind una dintre cele mai eficiente soluții de reabilitare orală în cazurile de edentație parțială sau totală. Succesul tratamentului prin implant dentar depinde de o serie de factori biologici, mecanici și microbiologici, iar menținerea sănătății țesuturilor peri-implantare

reprezintă o condiție esențială pentru stabilitatea pe termen lung a implantului. Totuși, odată cu creșterea numărului de tratamente implantare, inflamațiile peri-implantare au devenit o problemă clinică tot mai frecventă, cu implicații majore asupra prognosticului implantului dentar.

Patologiile peri-implantare de natură infecțioasă includ mucozita peri-implantară și peri-implantita, ambele determinate în principal de acumularea biofilmului bacterian la nivelul marginii implantului. Dacă mucozita peri-implantară este o inflamație reversibilă, limitată la țesuturile moi, peri-implantita implică distrugerea progresivă a osului de susținere și reprezintă principala cauză a pierderii implanturilor dentare. Prevalența crescută a acestor afecțiuni a determinat intensificarea cercetărilor privind etiopatogenia lor, cu accent pe rolul microbiomului și al interacțiunilor bacteriene la nivelul suprafețelor implantare.

Microbiomul oral reprezintă un ecosistem complex, alcătuit din bacterii, virusuri, fungi, archaea și paraziți, care contribuie la menținerea echilibrului ecologic în cavitatea orală. În condiții de disbioză, echilibrul dintre microorganismele comensale și cele patogene este perturbat, favorizând apariția infecțiilor peri-implantare. Studiile recente au evidențiat diferențe semnificative între compoziția microbiotei din jurul implanturilor sănătoase și cea a implanturilor afectate de inflamație, subliniind caracterul polimicrobian al infecției și implicarea concomitentă a bacteriilor patogene și oportuniste, inclusiv a celor aparținând complexelor bacteriene parodontopatogene.

În paralel, numeroase cercetări au vizat caracteristicile suprafețelor implanturilor dentare, întrucât topografia și rugozitatea acestora influențează atât procesele de osteointegrare, cât și aderența bacteriană. Suprafețele nanostructurate din titan s-au dovedit promițătoare prin capacitatea lor de a stimula atașarea celulară și formarea țesutului osos, reducând totodată riscul colonizării microbiene. Cu toate acestea, niciun tratament de suprafață nu a reușit până în prezent să elimine complet riscul infecțiilor peri-implantare.

Prin urmare, înțelegerea detaliată a interacțiunii dintre biofilmul bacterian, suprafața implantului și răspunsul imun al gazdei este esențială pentru dezvoltarea unor strategii eficiente de prevenție și tratament. Cercetările actuale, inclusiv studiile efectuate în cadrul acestei teze, contribuie la clarificarea mecanismelor microbiene implicate în peri-implantită și la identificarea factorilor locali și sistemici care pot influența evoluția acesteia.

CONTRIBUȚII PERSONALE

Titlu: Principalele comunități bacteriene identificate la nivelul situsurilor afectate de peri-implantită: o revizuire sistematică

Scop / Obiective:

Scopul acestui studiu a fost de a identifica principalele specii bacteriene implicate în etiopatogenia peri-implantitei, prin analiza și sinteza datelor publicate în literatura de specialitate. S-a urmărit caracterizarea compoziției microbiene asociate leziunilor peri-implantare și evidențierea similarităților dintre comunitățile bacteriene din peri-implantită și cele din boala parodontală.

Material și metode:

A fost realizată o analiză sistematică conform ghidurilor PRISMA 2020, înregistrată în baza PROSPERO (CRD42022335476). Căutarea articolelor a fost efectuată în bazele de date PubMed, Embase și Web of Science, folosind combinații de termeni MeSH precum “periimplantitis”, “bacteria”, “biofilm”, “microbiota”. Dintre cele 980 de lucrări identificate, 25 au îndeplinit criteriile de includere, respectiv studii clinice efectuate pe pacienți cu implanturi dentare afectate de peri-implantită. Analiza datelor a fost realizată pe baza metodelor de izolare bacteriană (culturi clasice, hibridizare ADN-ADN, secvențiere 16S rRNA). Calitatea studiilor a fost evaluată cu scala Newcastle–Ottawa (NOS).

Rezultate:

Cele mai frecvent izolate bacterii din zonele afectate de peri-implantită au fost microorganismele anaerobe Gram-negative. Analiza comparativă a arătat o asociere constantă între speciile aparținând complexului roșu (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*) și cele din complexul portocaliu (*Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter spp.*), implicate și în parodontită. De asemenea, au fost identificate și bacterii Gram-negative aerobe oportuniste, indicând un caracter polimicrobian al infecției.

Concluzii:

Rezultatele acestei analize sistematice demonstrează existența unei similitudini între flora bacteriană asociată peri-implantitei și cea implicată în bolile parodontale. Peri-implantita este o infecție polimicrobiană dominată de bacterii anaerobe Gram-negative, în special din complexul roșu, ceea ce susține necesitatea unor strategii terapeutice țintite împotriva acestor patogeni principali.

Studiu 2. Corelații între Patologiile Infecțioase ale Implanturilor Dentare și Sinuzita Maxilară

Scop / Obiective:

Scopul studiului a fost de a analiza corelațiile existente între afecțiunile infecțioase peri-implantare și sinuzita maxilară, pornind de la datele publicate în literatura de specialitate. S-a urmărit identificarea mecanismelor patogenice, a factorilor de risc și a complicațiilor care pot apărea secundar intervențiilor chirurgicale de augmentare osoasă și inserării implanturilor dentare la nivelul maxilarului superior.

Material și metode:

Studiul a fost realizat conform ghidurilor PRISMA, incluzând articole publicate între 2000 și 2023 în bazele de date PubMed, Embase, Web of Science, Scopus și SpringerLink. Dintr-un total de 250 de articole identificate, 12 au îndeplinit criteriile de includere. Majoritatea lucrărilor selectate au fost rapoarte sau serii de cazuri, completate de un studiu caz-control. Calitatea metodologică a studiilor a fost evaluată printr-o versiune modificată a scalei Newcastle-Ottawa, cele mai multe fiind încadrate în categoria de calitate metodologică moderată spre ridicată.

Rezultate:

Toate studiile analizate au raportat o asociere pozitivă între infecțiile peri-implantare și sinuzita maxilară. Cele mai frecvente situații au fost cele în care peri-implantita a apărut după proceduri de sinus lift și augmentare osoasă, determinând extinderea infecției către sinusul maxilar. Complicațiile descrise includ sinuzită acută sau cronică, infecția grefei osoase, comunicări oro-antrale, migrarea implantului în sinus și reacții inflamatorii de corp străin. În cazuri izolate, infecția peri-implantară netratată a determinat complicații severe, precum abcese orbitare sau cerebrale.

Concluzii:

Studiul a demonstrat existența unei legături directe între patologiile infecțioase peri-implantare și sinuzita maxilară. Prevenția infecțiilor peri-implantare, respectarea protocoalelor chirurgicale, selecția atentă a pacienților și monitorizarea postoperatorie riguroasă sunt esențiale pentru reducerea riscului de complicații sinusale și pentru creșterea ratei de succes a implanturilor dentare.

Studiul 3. Explorarea factorilor de risc ai peri-implantitei : un studiu transversal

Scop / Obiective:

Lucrarea a urmărit identificarea speciilor bacteriene implicate în peri-implantită comparativ cu cele prezente la implanturile sănătoase și analiza influenței unor factori precum fumatul, genul, vârsta și tipul restaurării protetice asupra prevalenței bolii.

Material și metode:

A fost realizat un studiu transversal pe 22 de pacienți (50 de implanturi, dintre care 26 cu peri-implantită și 24 sănătoase), investigați între ianuarie 2023 și decembrie 2024 în două clinici private din Cluj-Napoca. Evaluarea clinică a inclus parametrii standard de diagnostic, iar analiza microbiologică a fost efectuată cu sistemul Vitek 2 Compact (BioMérieux, Franța). Datele au fost prelucrate statistic utilizând testele χ^2 , t-Student și Mann-Whitney U, cu prag de semnificație $p < 0,05$.

Rezultate:

Peri-implantita a fost independentă de gen și fumat, dar s-a manifestat mai frecvent la mandibulă (66,67%) comparativ cu maxilarul (30,0%) ($p = 0,011$). Restaurările protetice fixe cimentate s-au asociat semnificativ cu peri-implantita ($p = 0,022$), prezentând cele mai mari adâncimi de sondare. Analiza microbiologică a evidențiat o infecție polimicrobiană, cu predominanța speciilor *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus gordonii*, *S. constellatus*, *Staphylococcus aureus*, *Kocuria rosea* și *Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris*.

Concluzii:

Peri-implantita reprezintă o infecție polimicrobiană complexă, determinată de interacțiunea dintre bacterii patogene și oportuniste. Prevalența crescută la mandibulă și la restaurările cimentate subliniază importanța controlului biofilmului și a respectării riguroase a protocolului chirurgical și protetic în prevenirea complicațiilor peri-implantare.

Studiul 4. Aderența bacteriană și formarea biofilmului bacterian pe suprafața implanturilor dentare- studiu in vitro

Scop / Obiective:

Lucrarea a avut ca scop evaluarea competiției dintre celulele osteoblastice și bacteriile orale în fazele inițiale ale colonizării suprafețelor implantare cu topografia

diferite (Machined, SLA și NANO) și analiza influenței acestor caracteristici asupra aderenței celulelor osteoblaste și formării biofilmului.

Material și metode:

Au fost utilizate discuri din titan TiCP4 cu trei tipuri de suprafețe: Machined (strunjită), SLA (sablare și gravare acidă) și NANO (nanotuburi de TiO₂, 50–60 nm). Au fost testate două specii bacteriene – *Streptococcus oralis* (colonizator timpuriu) și *Enterococcus faecalis* (specie oportunistă) – în monoculturi și co-culturi cu celule mezenchimale din folicul dentar, pre-diferențiate osteogenic. Aderența celulară și bacteriană a fost evaluată prin microscopie de fluorescență, iar formarea biofilmului la 96 h prin metoda cristal violet, cu citire spectrofotometrică UV-VIS (590 nm).

Rezultate:

Suprafața NANO a favorizat aderența și menținerea celulelor pre-diferențiate din folicul dentar, în special la 48 h, și a prezentat o colonizare bacteriană mai redusă comparativ cu suprafețele SLA și Machined. În monoculturi, *E. faecalis* și *S. oralis* au arătat o aderență minimă pe suprafața NANO, comparativ cu SLA și MA. În modelele de co-cultură, prezența celulelor osteoblastice a redus semnificativ atașarea bacteriană, în special pe NANO. Analiza biofilmului a evidențiat valori minime pentru suprafața NANO și maxime pentru suprafața MA.

Concluzii:

Suprafața nanostructurată favorizează atașarea osteoblastelor și limitează colonizarea bacteriană, oferind un echilibru optim între osteointegrare și protecția antiinfecțioasă. Rezultatele subliniază importanța micro/nanotopografiei implanturilor în controlul biofilmului și necesitatea validării acestor date în studii in vivo.

CONCLUZII GENERALE

Cercetarea prezentată în cadrul acestei teze de doctorat evidențiază caracterul complex și multifactorial al peri-implantitei, o afecțiune determinată de interacțiunea dintre bacteriile orale, răspunsul gazdei și proprietățile suprafeței implantului. Rezultatele obținute, integrate cu datele din literatura de specialitate, susțin faptul că peri-implantita este o infecție polimicrobiană, dominată de bacterii anaerobe gram-negative, cu un rol major al biofilmului bacterian în inițierea și progresia proceselor inflamatorii peri-implantare.

Analiza sistematică a literaturii a evidențiat prezența constantă a unor specii bacteriene precum *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Treponema*, *Tannerella* și *Fusobacterium* în leziunile de peri-implantită, confirmând implicarea acestor bacterii în patogenia bolii și similitudinea lor cu flora asociată parodontitei. Totodată, s-a demonstrat că peri-implantita are o etiologie complexă, cu participarea unor bacterii oportuniste precum *Staphylococcus aureus* și *Candida albicans*, care contribuie la stabilitatea biofilmului și la rezistența la tratament.

Rezultatele studiului clinic realizat pe lotul de pacienți au confirmat caracterul polimicrobian al peri-implantitei, evidențiind faptul că severitatea inflamației nu este influențată semnificativ de factori demografici sau comportamentali, precum genul sau fumatul, ci mai ales de factori locali și protetici. Aceste date susțin importanța controlului strict al biofilmului și al igienei orale post-implantare în prevenirea complicațiilor.

Analiza corelațiilor dintre patologia peri-implantară și sinuzita maxilară a subliniat faptul că infecțiile de origine peri-implantară pot reprezenta un punct de plecare pentru procese infecțioase la nivelul sinusului maxilar, mai ales în cazurile cu intervenții de tip sinus lift sau augmentări osoase. Prevenirea și tratamentul prompt al peri-implantitei sunt astfel esențiale pentru evitarea complicațiilor infecțioase oro-sinusale și pentru menținerea integrității structurale a grefelor osoase și a implanturilor dentare.

Studiul experimental in vitro a adus dovezi suplimentare privind rolul proprietăților suprafeței implantului în competiția dintre celulele gazdei și bacterii pentru colonizarea inițială a suprafeței implantare. Suprafețele nanostructurate (NANO) au favorizat aderența și proliferarea osteoblaștilor și au redus semnificativ aderarea bacteriană și formarea biofilmului bacterian comparativ cu suprafețele prelucrate mecanic (Machined) și cele sablate acid (SLA). Aceste constatări confirmă ipoteza „race for the surface”, potrivit căreia rezultatul colonizării implantului este determinat de rapiditatea cu care celulele gazdei sau bacteriile ocupă suprafața disponibilă.

În ansamblu, rezultatele tezei susțin importanța prevenirii colonizării bacteriene în etapele precoce post-implantare, a alegerii materialelor și a suprafețelor

cu proprietăți pro-osteointegrative și anti-biofilm bacterian, precum și a aplicării unor protocoale riguroase de asepse, igienizare și monitorizare clinică. Implementarea acestor măsuri contribuie la reducerea riscului de peri-implantită, la prelungirea duratei de viață a implanturilor și la evitarea complicațiilor infecțioase de tip oro-sinusal.

ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE CERCETĂRII DOCTORALE

Cercetarea doctorală se distinge prin abordarea integrată și multidimensională a etiopatogenei peri-implantitei, combinând analiza clinică, studiul microbiologic sistematic și cercetarea experimentală *in vitro* asupra interacțiunii dintre suprafața implantului, celulele gazdei și bacteriile implicate în formarea biofilmului.

Originalitatea lucrării constă în corelarea, într-o manieră unitară, a rezultatelor provenite din studii clinice, observații experimentale și analize teoretice, oferind o perspectivă completă asupra mecanismelor prin care aderența bacteriană și structura suprafeței implantului influențează succesul osteointegrării și riscul de apariție al peri-implantitei.

Contribuțiile inovative ale tezei se concretizează prin:

- realizarea unei sinteze sistematice actualizate a principalelor comunități bacteriene implicate în peri-implantită, cu evidențierea caracterului polimicrobian al infecției și a similarității cu flora asociată parodontitei;
- efectuarea unei analize riguroase a literaturii de specialitate privind corelațiile dintre patologiile peri-implantare și sinuzita maxilară, care subliniază importanța prevenirii infecțiilor peri-implantare pentru evitarea complicațiilor oro-sinuale;
- analiza factorilor de risc și a particularităților clinice asociate peri-implantitei într-un lot reprezentativ de pacienți, contribuind la clarificarea rolului determinant al factorilor locali în patogeneza bolii;
- realizarea unui model experimental original, care a evidențiat influența tipului de suprafață (Machined, SLA, NANO) asupra aderenței bacteriene și a comportamentului osteoblaștilor, confirmând superioritatea suprafețelor nanostructurate în reducerea formării biofilmului.

Prin aceste contribuții, teza aduce o valoare științifică semnificativă în domeniul implantologiei orale, fundamentând dezvoltarea de suprafețe implantare cu proprietăți pro-osteointegrative și anti-biofilm și consolidând importanța unei abordări preventive în managementul peri-implantitei.

SUMMARY OF THE DOCTORAL THESIS

Bacterial adhesion and bacterial biofilm formation on the surface of dental implants

Doctoral student: **Simina Angela Lăcrimioara IUȘAN**

Doctoral supervisor: **Prof. Dr. Silviu ALBU**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS OF THE DOCTORAL THESIS

INTRODUCTION.....	1
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE.....	5
1. General aspects of dental implants.....	7
1.1. Main types of dental implants.....	7
1.2. Indications, contraindications, advantages and disadvantages of dental implants.....	8
1.3. Materials used for dental implant manufacturing	10
2. Infectious peri-implant pathologies	13
2.1. Anatomy of peri-implant tissues.....	13
2.2. Peri-implant mucositis.....	14
2.3. Peri-implantitis	15
3. The oral microbiome.....	21
3.1. Introduction	21
3.2. Biogeography of the oral cavity microbiome.....	22
3.3. Main components of the oral microbiome.....	23
3.3.1. Viruses.....	24
3.3.2. Archaea.....	25
3.3.3. Fungi.....	25
3.3.4. Parasites.....	26

3.3.5. Bacteria	27
3.4. Bacterial species identified in healthy peri-implant tissues.....	28
3.5. Bacterial species identified in peri-implant mucositis.....	29
3.6. Bacterial species identified in peri-implantitis	31
PERSONAL CONTRIBUTION.....	35
4. Aim and objectives	37
5. Main bacterial communities identified in the sites affected by peri-implantitis: a systematic review	39
5.1. Introduction	39
5.2. Objectives	41
5.3. Materials and methods.....	42
5.3.1 Search strategy.....	42
5.3.2. Inclusion and exclusion criteria.....	42
5.3.3 Study selection and data collection	43
5.4. Results	48
5.4.1. Bibliographic documentation and article selection.....	48
5.4.2 Clinical and microbiological characteristics of the included studies	49
5.5. Discussion.....	52
5.6. Conclusions	54
6. Study 2. Correlations between dental implant infectious pathologies and maxillary sinusitis	55
6.1. Introduction	55

6.1.1. Dental implants and bone evaluation.....	55
6.1.2. Bone augmentation techniques	55
6.1.3. Sinus complications associated with bone augmentation and implant placement.....	55
6.2. Materials and methods.....	56
6.2.1. Research strategy	56
6.2.2. Inclusion and exclusion criteria	57
6.2.3. Study selection and data collection	57
6.2.4. Risk of bias assessment (methodological quality).....	58
6.3. Results	59
6.3.1. Study characteristics	59
6.3.2. Correlation between pathologies	61
6.3.2.1. Peri-implantitis, sinus lift with bone augmentation, and acute or chronic sinusitis	61
6.3.2.2. Peri-implantitis, sinusitis, and brain abscess	62
6.3.2.3. Peri-implantitis and oroantral communications.....	63
6.3.2.4. Implant migration/bone graft extrusion into the maxillary sinus and sinusitis	63
6.3.2.5. Zygomatic implants and sinusitis	64
6.3.3. Extrapolation of results.....	64
6.4. Discussion.....	64
6.5. Conclusions	67

7. Study 3. Exploration of risk factors for peri-implantitis: a cross-sectional study.....	69
7.1. Introduction.....	69
7.2 Materials and methods.....	70
7.2.1. Study sample.....	70
7.2.2. Eligibility criteria.....	71
7.2.3. Case definition.....	71
7.2.4. Outcomes measured.....	71
7.2.5. Data collection.....	72
7.2.5.1. Medical records	72
7.2.5.2. Clinical examination.....	72
7.2.6. Microbiological sampling and examination	72
7.2.7. Reproducibility and repeatability	73
7.2.8. Statistical analysis.....	74
7.2.9. Risk of bias assessment	74
7.3 Results	74
7.3.1. Study population.....	74
7.3.2. Clinical results	75
7.3.2.1. Gender distribution.....	76
7.3.2.2. Age groups.....	77
7.3.2.3. Smokers/non-smokers distribution	78
7.3.2.4. Maxilla/mandible distribution	79

7.3.2.5. Treatment stage and type of prosthesis.....	81
7.3.3. Microbiological results	83
7.4. Discussion.....	86
7.4.1. Main findings—consistencies and discrepancies with previous studies	86
7.4.2. Study limitations.....	92
7.5. Conclusions	93
8. Study 4. Bacterial adhesion and biofilm formation on dental implant surfaces: an <i>in vitro</i> study.....	95
8.1 Introduction	95
8.2 Materials and methods.....	96
8.2.1 Materials	96
8.2.2 Preparation of titanium discs	98
8.2.3 Cell preparation	98
8.2.3.1. Collection of the dental follicle	99
8.2.3.2. Primary culture of cells isolated from the dental follicle	99
8.2.3.3. Subculture protocol.....	100
8.2.3.4. Short- and long-term storage of MSCs.....	100
8.2.3.5. Cell thawing protocol	100
8.2.3.6. Characterization of isolated cells.....	101
8.2.3.7. Immunocytochemical staining protocol	101
8.2.3.8. Stem cell labeling for flow cytometry analysis	102

8.2.3.9. Osteogenic differentiation	102
8.2.4 Optimization of dental follicle MSC culture on titanium discs..	105
8.2.5 Co-culture experiments of osteogenically pre-differentiated FD- MSCs and bacteria.....	107
8.2.6 Biofilm evaluation	110
8.2.7 Statistical analysis.....	110
8.3 Results.....	111
8.3.1 Evaluation of the adhesion of pre-differentiated dental follicle cells on the three titanium surfaces.....	111
8.3.2 Evaluation of <i>Enterococcus faecalis</i> and <i>Streptococcus oralis</i> adhesion on the three titanium surfaces.....	112
8.3.3 Evaluation of co-culture models A, B, and C with pre- differentiated FD cells and bacteria.....	113
8.3.4 Evaluation of biofilm formation on the three surfaces	121
8.4 Discussion.....	121
8.4.1 Main findings—consistencies and discrepancies with previous studies	121
8.4.2 Study limitations.....	127
8.5 Conclusions	127
9. General conclusions	129
10. Originality and innovative contributions of the doctoral research ..	131
REFERENCES.....	132

Keywords: bacterial adhesion, bacterial biofilm, dental implant, osteoblasts, osseointegration, peri-implantitis, nanostructured surfaces, titanium.

LIST OF PUBLICATIONS

Articles published *in extenso* as a result of the doctoral research

4. Iușan SAL, Lucaciu OP, Petrescu NB, Mirică IC, Toc D-A, Albu S, Costache C. The Main Bacterial Communities Identified in the Sites Affected by Periimplantitis: A Systematic Review. *Microorganisms*. 2022; 10(6):1232. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061232>. *ISI Factor de impact JCR2022-4,5, Q2 (study included in chapter 5)*
5. Iușan SAL, Costache C, Lucaciu OP, Petrescu B-N, Mirică IC, Toc D-A, Albu S. Correlations between Dental Implant Infectious Pathologies and Maxillary Sinusitis: A Review Article. *Journal of Clinical Medicine*. 2023; 12(15):5059. <https://doi.org/10.3390/jcm12155059>. *ISI Factor de impact JCR2023-3, Q1(study included in chapter 6).*
6. Iușan SAL, Lucaciu OP, Petrescu NB, Mirică IC, Toc D-A, Albu S, Costache C. Exploring Peri-Implantitis Risk-Factors: A Cross-Sectional Study. *Dentistry Journal*. 2025; 13(4):148. <https://doi.org/10.3390/dj13040148>. *ISI Factor de impact JCR2024-3,1, Q1(study included in chapter 7).*

INTRODUCTION

Maintaining peri-implant health is a major challenge in modern dental implantology, given the increasing incidence of implant-associated infections and their impact on long-term bone stability. Bacterial colonization and biofilm formation on implant surfaces can compromise the osseointegration process and lead to the occurrence of peri-implantitis, one of the main causes of implant treatment failure. In this context, the analysis of the composition of the peri-implant microbiota and the interactions between bacteria and the implant surface contributes to a better understanding of the mechanisms involved in the success or failure of osseointegration and to the development of strategies to prevent peri-implant infections.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

In recent decades, dental implantology has undergone significant development, becoming one of the most effective oral rehabilitation solutions in cases of partial or total edentulism. The success of dental implant treatment depends on a series of biological, mechanical and microbiological factors, and maintaining the health of peri-implant tissues is an essential condition for the long-term stability of the implant. However, with the increase in the number of implant treatments, peri-implant inflammation has become an increasingly frequent clinical problem, with major implications for the prognosis of the dental implant.

Peri-implant pathologies of an infectious nature include peri-implant mucositis and peri-implantitis, both of which are mainly determined by the accumulation of bacterial biofilm at the implant margin. While peri-implant mucositis is a reversible inflammation limited to soft tissues, peri-implantitis involves the progressive destruction of the supporting bone and is the main cause of dental implant loss. The increased prevalence of these conditions has led to increased research on their etiopathogenesis, with an emphasis on the role of the microbiome and bacterial interactions at the implant surfaces.

The oral microbiome is a complex ecosystem, composed of bacteria, viruses, fungi, archaea and parasites, which contribute to maintaining the ecological balance in the oral cavity. Under conditions of dysbiosis, the balance between commensal and pathogenic microorganisms is disturbed, favoring the occurrence of peri-implant infections. Recent studies have highlighted significant differences between the composition of the microbiota around healthy implants and that of implants affected by inflammation, highlighting the polymicrobial nature of the infection and the concomitant involvement of pathogenic and opportunistic bacteria, including those belonging to the periodontopathic bacterial complexes.

In parallel, numerous studies have focused on the characteristics of dental implant surfaces, as their topography and roughness influence both osseointegration processes and bacterial adhesion. Nanostructured titanium surfaces have shown promise in their ability to stimulate cell attachment and bone formation, while reducing the risk of microbial colonization. However, no surface treatment has been able to completely eliminate the risk of peri-implant infections to date.

Therefore, a detailed understanding of the interaction between the bacterial biofilm, the implant surface and the host immune response is essential for the development of effective prevention and treatment strategies. Current research, including the studies conducted within this thesis, contributes to clarifying the microbial mechanisms involved in peri-implantitis and to identifying local and systemic factors that may influence its evolution.

PERSONAL CONTRIBUTIONS

Title: Main bacterial communities identified in the sites affected by peri-implantitis: a systematic review

Aim / Objectives:

The aim of this study was to identify the main bacterial species involved in the etiopathogenesis of peri-implantitis, by analyzing and synthesizing data published in the specialized literature. The aim was to characterize the microbial composition associated with peri-implant lesions and highlight the similarities between the bacterial communities in peri-implantitis and those in periodontal disease.

Material and methods:

A systematic review was performed according to the PRISMA 2020 guidelines, registered in the PROSPERO database (CRD42022335476). The search for articles was performed in the PubMed, Embase and Web of Science databases, using combinations of MeSH terms such as “periimplantitis”, “bacteria”, “biofilm”, “microbiota”. Of the 980 works identified, 25 met the inclusion criteria, namely clinical studies performed on patients with dental implants affected by peri-implantitis. Data analysis was performed based on bacterial isolation methods (classical cultures, DNA-DNA hybridization, 16S rRNA sequencing). The quality of the studies was assessed with the Newcastle–Ottawa scale (NOS).

Results:

The most frequently isolated bacteria from the peri-implantitis affected areas were Gram-negative anaerobic microorganisms. Comparative analysis showed a constant association between species belonging to the red complex (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*) and those of the orange complex (*Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter* spp.), also involved in periodontitis. Opportunistic aerobic Gram-negative bacteria were also identified, indicating a polymicrobial nature of the infection.

Conclusions:

The results of this systematic review demonstrate the existence of a similarity between the bacterial flora associated with peri-implantitis and that involved in periodontal diseases. Peri-implantitis is a polymicrobial infection dominated by Gram-

negative anaerobic bacteria, especially from the red complex, which supports the need for targeted therapeutic strategies against these main pathogens.

Study 2. Correlations between dental implant infectious pathologies and maxillary sinusitis

Aim / Objectives:

The aim of the study was to analyze the correlations between peri-implant infectious diseases and maxillary sinusitis, based on data published in the specialized literature. The aim was to identify pathogenic mechanisms, risk factors and complications that may occur secondary to bone augmentation surgeries and dental implant insertion in the upper jaw.

Material and methods:

The study was conducted according to the PRISMA guidelines, including articles published between 2000 and 2023 in the PubMed, Embase, Web of Science, Scopus and SpringerLink databases. Of a total of 250 articles identified, 12 met the inclusion criteria. The majority of the selected papers were case reports or series, supplemented by a case-control study. The methodological quality of the studies was assessed using a modified version of the Newcastle-Ottawa scale, with most being classified as moderate to high methodological quality.

Results:

All studies reviewed reported a positive association between peri-implant infections and maxillary sinusitis. The most common situations were those in which peri-implantitis occurred after sinus lift and bone augmentation procedures, causing the infection to spread to the maxillary sinus. The complications described include acute or chronic sinusitis, bone graft infection, oroantral communications, implant migration into the sinus, and foreign body inflammatory reactions. In isolated cases, untreated peri-implant infection has caused severe complications, such as orbital or cerebral abscesses..

Conclusions:

The study demonstrated a direct link between peri-implant infectious pathologies and maxillary sinusitis. Prevention of peri-implant infections, adherence to surgical protocols, careful patient selection, and rigorous postoperative monitoring are essential to reduce the risk of sinus complications and increase the success rate of dental implants.

Study 3. Exploring risk factors of peri-implantitis: a cross-sectional study

Aim / Objectives:

The study aimed to identify the bacterial species involved in peri-implantitis compared to those present in healthy implants and analyze the influence of factors such as smoking, gender, age and type of prosthetic restoration on the prevalence of the disease.

Material and methods:

A cross-sectional study was conducted on 22 patients (50 implants, of which 26 with peri-implantitis and 24 healthy), investigated between January 2023 and December 2024 in two private clinics in Cluj-Napoca. Clinical evaluation included standard diagnostic parameters, and microbiological analysis was performed with the Vitek 2 Compact system (BioMérieux, France). Data were statistically processed using the χ^2 , t-Student and Mann–Whitney U tests, with a significance threshold of $p < 0.05$.

Results:

Peri-implantitis was independent of gender and smoking, but occurred more frequently in the mandible (66.67%) compared to the maxilla (30.0%) ($p = 0.011$). Cemented fixed prosthetic restorations were significantly associated with peri-implantitis ($p = 0.022$), presenting the greatest probing depths. Microbiological analysis revealed a polymicrobial infection, with the predominance of *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus gordonii*, *S. constellatus*, *Staphylococcus aureus*, *Kocuria rosea* and *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*.

Conclusions:

Peri-implantitis is a complex polymicrobial infection, driven by the interaction of pathogenic and opportunistic bacteria. The increased prevalence in the mandible and cemented restorations highlights the importance of biofilm control and rigorous adherence to surgical and prosthetic protocols in preventing peri-implant complications.

Study 4. Bacterial adhesion and bacterial biofilm formation on the surface of dental implants - in vitro study

Aim / Objectives:

The study aimed to evaluate the competition between osteoblastic cells and oral bacteria in the initial phases of colonization of implant surfaces with different topographies (Machined, SLA and NANO) and to analyze the influence of these characteristics on osteoblastic cell adhesion and biofilm formation..

Material and methods:

TiCP4 titanium discs with three types of surfaces were used: Machined (turned), SLA (sandblasting and acid etching) and NANO (TiO₂ nanotubes, 50–60 nm). Two bacterial species – *Streptococcus oralis* (early colonizer) and *Enterococcus faecalis* (opportunistic species) – were tested in monocultures and co-cultures with osteogenically pre-differentiated dental follicle mesenchymal cells. Cellular and bacterial adhesion was assessed by fluorescence microscopy, and biofilm formation at 96 h by the crystal violet method, with UV-VIS spectrophotometric reading (590 nm).

Results:

The NANO surface favored the adhesion and maintenance of pre-differentiated dental follicle cells, especially at 48 h, and showed less bacterial colonization compared to SLA and Machined surfaces. In monocultures, *E. faecalis* and *S. oralis* showed minimal adhesion to the NANO surface compared to SLA and MA. In co-culture models, the presence of osteoblastic cells significantly reduced bacterial attachment, especially on NANO. Biofilm analysis revealed minimum values for the NANO surface and maximum values for the MA surface.

Conclusions:

The nanostructured surface favors osteoblast attachment and limits bacterial colonization, providing an optimal balance between osteointegration and anti-infective protection. The results emphasize the importance of implant micro/nanotopography in biofilm control and the need to validate these data in in vivo studies.

GENERAL CONCLUSIONS

The research presented in this doctoral thesis highlights the complex and multifactorial nature of peri-implantitis, a condition determined by the interaction between oral bacteria, the host response and the properties of the implant surface. The results obtained, integrated with data from the specialized literature, support the fact that peri-implantitis is a polymicrobial infection, dominated by anaerobic gram-negative bacteria, with a major role of the bacterial biofilm in the initiation and progression of peri-implant inflammatory processes.

A systematic analysis of the literature highlighted the constant presence of bacterial species such as *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Treponema*, *Tannerella* and *Fusobacterium* in peri-implantitis lesions, confirming the involvement of these bacteria in the pathogenesis of the disease and their similarity to the flora associated with periodontitis. At the same time, it was demonstrated that peri-implantitis has a complex etiology, with the participation of opportunistic bacteria such as *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*, which contribute to the stability of the biofilm and resistance to treatment.

The results of the clinical study conducted on the patient group confirmed the polymicrobial nature of peri-implantitis, highlighting that the severity of inflammation is not significantly influenced by demographic or behavioral factors, such as gender or smoking, but mainly by local and prosthetic factors. These data support the importance of strict control of the biofilm and post-implant oral hygiene in preventing complications.

The analysis of the correlations between peri-implant pathology and maxillary sinusitis highlighted the fact that infections of peri-implant origin can represent a starting point for infectious processes in the maxillary sinus, especially in cases with sinus lift or bone augmentation interventions. Prevention and prompt treatment of peri-implantitis are thus essential for avoiding oro-sinusal infectious complications and for maintaining the structural integrity of bone grafts and dental implants.

The *in vitro* experimental study provided additional evidence regarding the role of implant surface properties in the competition between host cells and bacteria for the initial colonization of the implant surface. Nanostructured surfaces (NANO) favored osteoblast adhesion and proliferation and significantly reduced bacterial adhesion and bacterial biofilm formation compared to machined and acid-blasted surfaces (SLA). These findings confirm the "race for the surface" hypothesis, according

to which the outcome of implant colonization is determined by the speed with which host cells or bacteria occupy the available surface. Overall, the results of the thesis support the importance of preventing bacterial colonization in the early post-implantation stages, of choosing materials and surfaces with pro-osteointegrative and anti-bacterial biofilm properties, as well as of applying rigorous asepsis, sanitation and clinical monitoring protocols. The implementation of these measures contributes to reducing the risk of peri-implantitis, extending the lifespan of implants and avoiding oro-sinusal infectious complications.

ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF DOCTORAL RESEARCH

The doctoral research is distinguished by its integrated and multidimensional approach to the etiopathogenesis of peri-implantitis, combining clinical analysis, systematic microbiological study and *in vitro* experimental research on the interaction between the implant surface, host cells and bacteria involved in biofilm formation.

The originality of the work consists in the correlation, in a unitary manner, of the results from clinical studies, experimental observations and theoretical analyses, providing a complete perspective on the mechanisms by which bacterial adhesion and the structure of the implant surface influence the success of osseointegration and the risk of peri-implantitis.

The innovative contributions of the thesis are embodied in:

- the achievement of an updated systematic synthesis of the main bacterial communities involved in peri-implantitis, highlighting the polymicrobial nature of the infection and the similarity with the flora associated with periodontitis;
- conducting a rigorous analysis of the specialized literature on the correlations between peri-implant pathologies and maxillary sinusitis, which emphasizes the importance of preventing peri-implant infections to avoid oro-sinus complications;
- analyzing the risk factors and clinical features associated with peri-implantitis in a representative group of patients, contributing to clarifying the determining role of local factors in the pathogenesis of the disease;
- creating an original experimental model, which highlighted the influence of the type of surface (Machined, SLA, NANO) on bacterial adhesion and osteoblast behavior, confirming the superiority of nanostructured surfaces in reducing biofilm formation.

Through these contributions, the thesis brings significant scientific value to the field of oral implantology, substantiating the development of implant surfaces with pro-osteointegrative and anti-biofilm properties and reinforcing the importance of a preventive approach in the management of peri-implantitis.

