

Programul European - ERA-NET EuroNanoMed III

DENUMIREA PROIECTULUI

Nano-funcționalitatea antimicrobiană a matricelor de fibre de mătase îmbogățite cu peptide pentru a preveni infecțiile osoase și pentru a spori osteointegrarea implantului în ortopedie și stomatologie.

ACRONIM

ANNAFIB

SURSA DE FINANȚARE

ANNAFIB este finanțat în cadrul consorțiului de cercetare EuroNanoMed III Joint Translational Call, în România, de următoarele agenții:

EuroNanoMed 3



UEFISCDI



CONSORȚIU

Proiectul se desfășoară în cadrul unui consorțiu alcătuit din:

Instituția	Rol	Director de proiect
IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi (Milano, Italia)	Coordonator	Dr. Arianna B. Lovati
Institutul Național de Cercetare Dezvoltare Medico-Militară „Cantacuzino,,	Membru	Dr. Coman Cristin

Silk Biomaterials S.r.l. (SME, Lomazzo (CO), Italia)	Membru	Dr. Giuliano Freddi
National Centre for Scientific Research "Demokritos" (Atena, Greece)	Membru	Dr. Zili Sideratou
Tel Aviv University (Tel Aviv, Israel)	Membru	Prof. Carlos E. Nemcovsky

Institutul Național de Cercetare Dezvoltare Medico-Militară „Cantacuzino,,

Director de proiect – dr. Coman Cristin

Dr. Cristin Coman a absolvit Facultatea de Medicină Veterinară în 1989 în Iași și doctoratul în 2003 la Facultatea de Medicină Veterinară din București. A făcut 2 stagii de pregătire în managementul al instalațiilor de animale la compania Charles River (Ungaria) și de genetica șoarecilor la Institutul Pasteur, Paris (Franța) și a absolvit cursul FELASA tip C la Universitatea din Utrecht (Olanda). În 2018 a obținut certificatul de specialist în știința și medicina animalelor de laborator la Universitatea din Toulouse. În prezent lucrează ca medic veterinar și cercetător la Institutul Național de Cercetare Dezvoltare Medico-Militară „Cantacuzino,,. El participă la toate proiectele de cercetare care implică studii pe animale (studii de microbiologie și imunologie) și biocompatibilitatea dispozitivelor medicale. Este membru al comitetelor de bioetică din 2 universități și este consultant extern pentru 2 institute. Face parte din consiliul editorial a 3 reviste veterinare românești.



REZUMAT

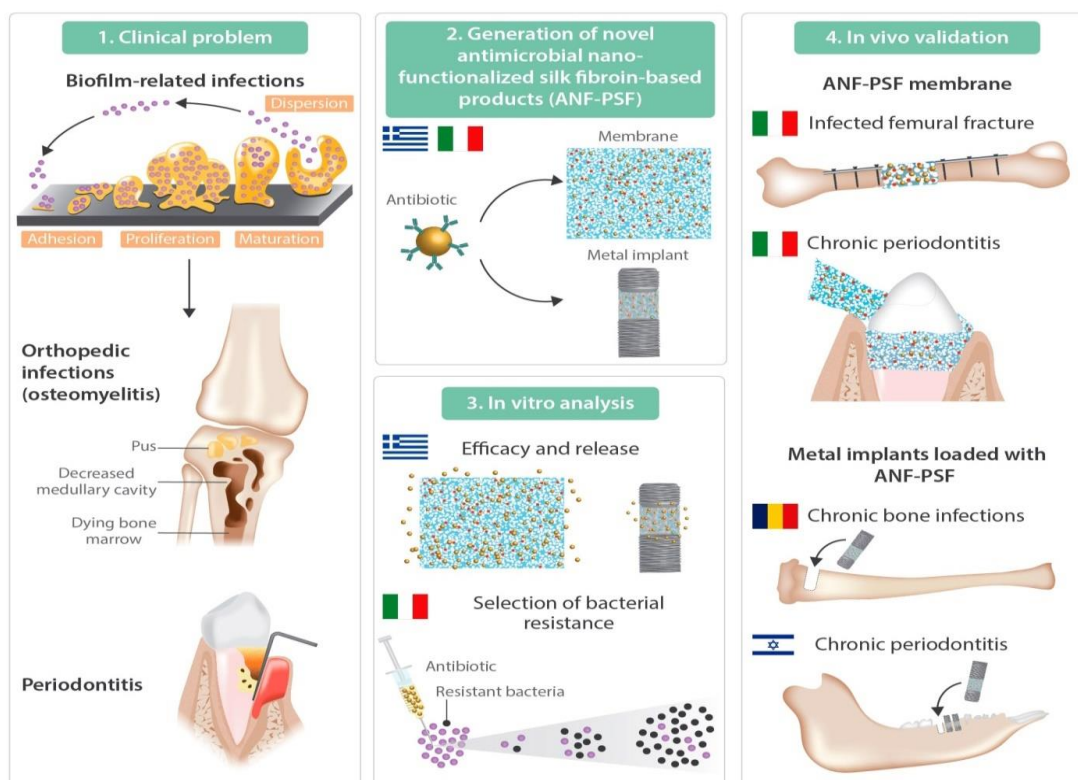
Infecțiile conexe implanturilor reprezintă o problemă medicală mare în ortopedie și implantologia dentară. Formarea biofilmului bacterian este una dintre principalele cauze ale acestor infecții care duc la apariția unor tulburări și consecințe severe, cum ar fi slăbirea implantului. Profilaxia / terapia antibiotică curentă este inadecvată pentru a preveni formarea biofilmului și generează rezistență la antibiotice. Astfel, dezvoltarea unor noi matrici îmbogățite cu antibiotice biomimetice are un potențial neprețuit de a atinge la nivel local atât furnizarea de agenți antimicrobieni cât și osteointegrarea dispozitivelor implantate. Acest proiect are drept scop inhibarea formării biofilmelor și refacerea țesuturilor osoase și parodontale afectate în cazul infecțiilor ce apar după implanturi. Pentru a face acest lucru, în cadrul proiectului se va investiga in vitro și in vivo funcționarea și eficacitatea matricelor antimicrobiene nano-funcționalizate cu fibrină de mătase îmbogățită cu peptide (ANF-PSF), matrici fabricate și utilizate atât ca materiale ce vor purta și elibera medicamentele, cât și ca materiale ce vor produce regenerare. Matricile de fibrină de mătase vor fi îmbogățite cu peptide, apoi nano-funcționalizate cu antibiotice și evaluate pentru capacitatea de încorporare și eliberare a medicamentelor. Aceste matrici urmează apoi să fie testate pe modele experimentale animale de fracturi infectate, parodontita și infecții legate de implanturi.

Eliberarea locală a antibioticelor cu controlul profilelor de eliberare și modificarea dispozitivelor de implantat cu proprietăți osteoinductive reprezintă o abordare inovatoare și sinergică pentru a promova simultan integrarea implanturilor osoase înainte de atașările bacteriene, prevenind astfel formarea biofilmelor și complicațiile severe ale acestora. ANF-PSF pot fi utilizate ca membrane în fracturi infectate sau parodontite sau încărcate în interiorul acestor dispozitive metalice poroase pentru proteze articulare și implanturi dentare. La sfârșitul studiilor, acest proiect va valida o nouă strategie terapeutică care să prevină sau să trateze atât infecțiile osoase, cât și infecțiile parodontale. Rezultatele acestui proiect vor fi exploatate și diseminate prin intermediul unor activități specifice, cum ar fi evenimente pentru investitori, comunitate științifică și pacienți.

OBIECTIVUL PROIECTULUI

Obiectivul ANNAFIB este de a îmbunătăți osteointegrarea implantului osos prin prevenirea formării biofilmului bacterian utilizând membrane / bureți din fibrină din matase îmbogățite cu peptide (PSF) și nanofuncționalizate cu agenți antimicrobieni (ANF) care pot fi utilizați sau nu cu implanturile metalice într-o procedură chirurgicală personalizată într-o singură etapă, în cazul fracturi compuse, implantologiei protetică și dentară. Membranele / bureții din fibre de mătase îmbogățite cu peptide și nanofuncționalizate cu agenți antimicrobieni (ANF-PSF) vor fi fabricate și utilizate atât ca materiale ce vor elibera a medicamentelor, cât și ca materiale ce vor contribui la regenerare. Scopul principal este realizarea superioară a stabilizării implantului datorită activității duble a ANF-PSF în prevenirea infecțiilor osoase și stimularea osteoinducției. În special, ANF-PSF ar putea fi utilizată sub formă de membrană în fracturi sau parodontite infectate sau încărcată în dispozitive metalice poroase pentru protezele articulare și implanturi dentare. ANNAFIB va investiga *in vitro* și va valida *in vivo* funcția și eficacitatea ANF-PSF.

Schema proiectului (preluată de pe pagina proiectului, www.annafib.eu)



REZULTATE ESTIMATE

Rezultatele ANNAFIB vor consta în dezvoltarea membranelor antimicrobiene nano-funcționalizate cu fibrină de mătase îmbogățită cu peptide (ANF-PSF) și a dispozitivelor de implanturi metalice complet echipate pentru utilizarea ortopedică și dentară care promovează sinergic osteointegrarea și prevenirea/tratamentul infecțiilor bacteriene. Planul de acțiune și metodologii fac posibilă realizarea acestora și va furniza un nou instrument pentru a ajuta la rezolvarea problemei infecțiilor bacteriene în două dintre cele mai importante domenii clinice: ortopedie și stomatologie.

Constituirea unui parteneriat multidisciplinar - care combină un institut privat de cercetare clinică, institute publice de cercetare academică și non-academică și un IMM. Pe lângă atingerea obiectivelor ANNAFIB, ne-am imaginat că parteneriatul constituit va pune bazele viitoarelor colaborări în contextul nanomedicinii translaționale. Într-adevăr, acest consorțiu cuprinde competențe multidisciplinare necesare pentru a trece din laborator la pacient. Prezentul proiect acoperă două domenii de cercetare diferite: medicina regenerativă (regenerarea osoasă și osteointegrarea) și sisteme specifice de livrare a medicamentelor (agenți antimicrobieni).

Realizarea acestor două obiective va reprezenta un progres semnificativ în ceea ce privește stadiul tehnicii, în cadrul căruia în prezent lipsește o soluție multifuncțională dar autonomă capabilă să îmbunătățească reparația oaselor și să combată simultan infecțiile microbiene.

Un alt rezultat așteptat este integrarea disciplinelor prin participarea activă a părților interesate care reprezintă diferite sectoare societale. Proiectul ANNAFIB va acționa ca un punct focal pentru oamenii de știință, ingineri și tehnicieni din mediul academic și IMM-uri, care lucrează în domeniul dezvoltării nanomaterialelor, al caracterizării fizico-chimice, al evaluării *in vitro* și *in vivo*, al familiarizării cu abordări diferite. Activitățile de cercetare preconizate, desfășurate în comun, vor stimula interacțiunea și cercetarea în domeniul chimiei, științelor materialelor, ortopediei, stomatologiei și biologiei, stimulând cooperarea oamenilor de știință cu diferite experiențe și din diferite țări, care vizează abordarea provocărilor mediului și societății. dezvoltarea unei economii durabile.

Activitățile de difuzare planificate vor spori vizibilitatea proiectului pe comunitățile și grupurile țintă selectate, atât la nivel european, cât și la nivel internațional. Pentru a maximiza impactul, se va acorda o atenție deosebită apropierea grupurilor specifice ale părților interesate, cum ar fi: factorii de decizie (EC, organizațiile civile și ale societății civile, ONG-urile etc.), cadre universitare, grupuri de consultare, investitori, potențiali utilizatori finali comerciali și publicul larg. Va fi pusă în aplicare depozitarea publicațiilor într-un depozit online selectat prin intermediul serviciului Open Access Infrastructure for Research in

Europe (OpenAIRE) sau al Registrului de depozite de acces deschis (ROAR, <http://roar.eprints.org/>).

Institutul Cantacuzino își va extinde experiența anterioară asupra modelelor de animale pe osteomieliță, consolidând astfel o platformă experimentală cuprinzătoare, multidisciplinară, pentru abordări viitoare în medicina inovatoare și / sau materiale pentru terapia osteomielitei.

REZULTATE ALE PROIECTULUI

Articole

Bottagisio M, Coman C, Lovati AB. Animal models of orthopaedic infections. A review of rabbit models used to induce long bone bacterial infections. J Med Microbiol. 2019;68(4):506-537.

<https://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.000952#tab2>

Diana – Larisa Ancuța, Cristin Coman, Diana Mihaela Alexandru, Maria Crivineanu. Animal Models Used in Testing the Biocompatibility of the Dental Implant – A Review. Bulletin UASVM Veterinary Medicine 77(2)/2020 <http://dx.doi.org/10.15835/buasy>

<https://journals.usamvcluj.ro/index.php/veterinary/issue/view/403>

Diana-Larisa Ancuța, Teodoru Soare, Diana Soare, Maria Crivineanu, Cristin Coman. Comparative study of osteomyelitis reproduced on rabbits using human strains of methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA) and methicillin-resistant staphylococcus epidermidis (MRSE). Scientific Works Series C. Veterinary Medicine Vol. LXVI, Issue 2, ISSN 2065-1295, 85-92, 2020

http://veterinarymedicinejournal.usamv.ro/pdf/2020/issue_2/Art13.pdf

CONTACT

INCDMM Cantacuzino

Splaiul Independenței nr. 103, Cod 050096, Sector 5, București

Telefon: +4 021.3069.100 centrală

Fax: +4 021.3069.307

Email – office.cantacuzino@mapn.ro

Dr. Coman Cristin

Tel 0722320012

Email - comancristin@yahoo.com

European Program - ERA-NET EuroNanoMed III

PROJECT NAME

Antimicrobial Nano-Functionalization of Peptide-enriched Silk Fibroin matrices to prevent bone infections and to enhance implant osseointegration in orthopedics and dentistry.

ACRONIM

ANNAFIB

SOURCE OF FINANCING

ANNAFIB is funded within the EuroNanoMed III Joint Translational Call research consortium, in Romania, by the following agencies:

EuroNanoMed 3



UEFISCDI



Executive Agency for Higher Education,
Research, Development and Innovation Funding

CONSORTIUM

The project is carried out within a consortium consisting of:

Institution	Role	Manager
IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi (Milan, Italy)	Coordonator	Dr. Arianna B. Lovati
"Cantacuzino" National Medico-Military Institute for Research and Development	Member	Dr. Coman Cristin

Silk Biomaterials S.r.l. (SME, Lomazzo (CO), Italy)	Member	Dr. Giuliano Freddi
National Centre for Scientific Research "Demokritos" (Athens, Greece)	Member	Dr. Zili Sideratou
Tel Aviv University (Tel Aviv, Israel)	Member	Prof. Carlos E. Nemcovsky

"Cantacuzino" National Medico-Military Institute for Research and Development

Project manager – dr. Coman Cristin

Dr. Cristin Coman graduated at the Faculty of Veterinary Medicine in 1989 in Iași and the doctorate in 2003 at the Faculty of Veterinary Medicine in Bucharest. He completed 2 training courses in animal management at Charles River (Hungary) and mouse genetics at Pasteur Institute, Paris (France) and completed the FELASA type C course at the University of Utrecht (Netherlands). In 2018 he obtained the certificate of specialist in science and medicine of laboratory animals at the University of Toulouse, France. Currently he works as a veterinarian and researcher at the "Cantacuzino" National Institute for Medical-Military Development Research. He participates in all research projects involving animal studies (microbiology and immunology studies) and biocompatibility of medical devices. He is a member of the bioethics committees of 2 universities and is an external consultant for 2 institutes. He is part of the editorial board of 3 Romanian veterinary journals.



SUMMARY

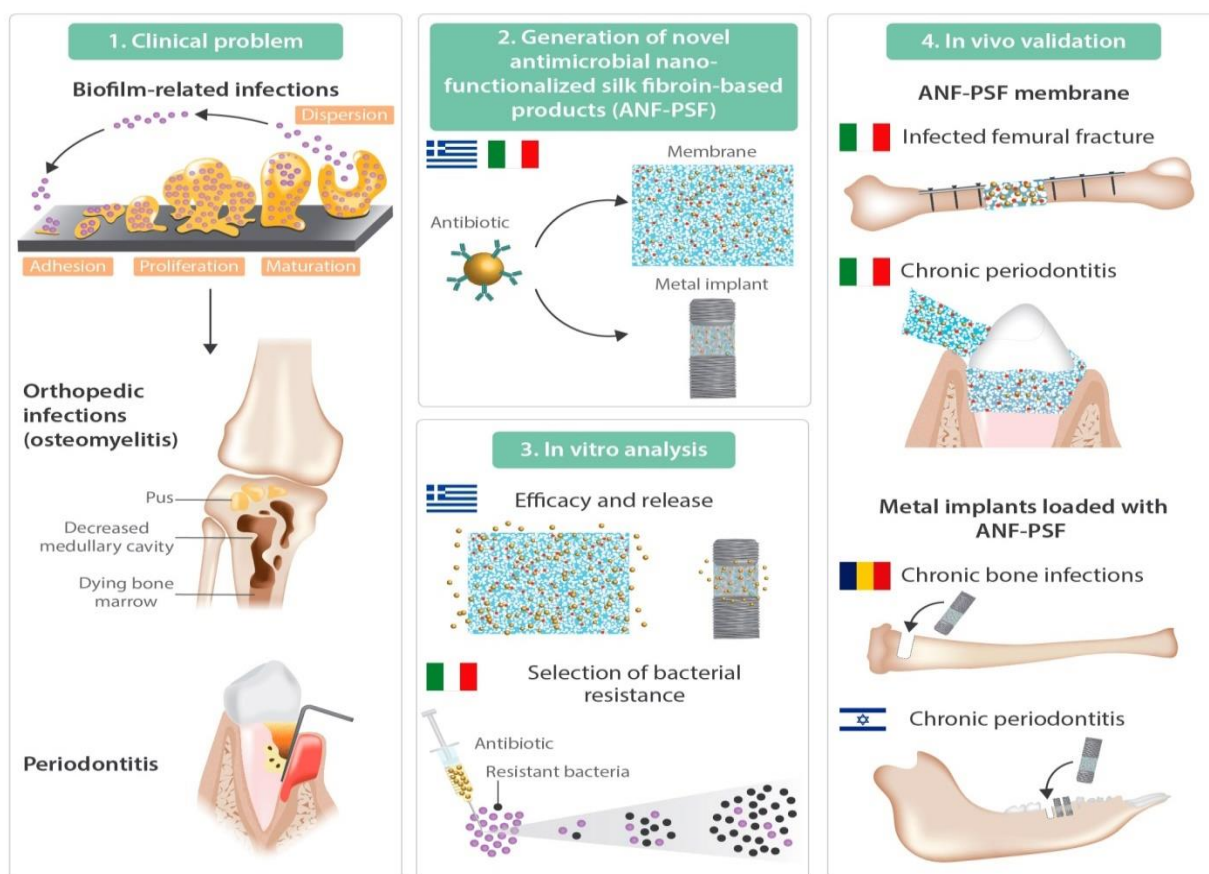
Implant-related infections are a major medical problem in orthopedics and dental implantology. The formation of bacterial biofilm is one of the main causes of these infections which lead to severe disorders and consequences, such as implant weakening. Prophylaxis / current antibiotic therapy is inadequate to prevent biofilm formation and generates antibiotic resistance. Thus, the development of new matrices enriched with biomimetic antibiotics has an invaluable potential to achieve both locally the supply of antimicrobial agents and the osseointegration of implanted devices. The aim of this project is to inhibit the formation of biofilms and to restore the affected bone and periodontal tissues in the case of infections occurring after implants. In order to do this, the function and effectiveness of the peptide-enriched silk fibrin (ANF-PSF) nano-functionalized antimicrobial matrices (ANF-PSF), fabricated and used as materials that will carry and release the drugs, as well as materials that will produce regeneration will be investigated *in vitro* and *in vivo*. The silk fibrin matrices will be enriched with peptides, then nano-functionalized with antibiotics and evaluated for drug incorporation and release ability. These matrices will then be tested on experimental animal models of infected fractures, periodontitis, and implant-related infections. The local release of antibiotics with the control of release profiles and the modification of implant devices with osteoinductive properties represent an innovative and synergistic approach to simultaneously promote the integration of bone implants before bacterial attachments, thus preventing the formation of biofilms and their severe complications. ANF-PSF can be used as membranes in infected or periodontitis fractures or loaded within these porous metal devices for joint prostheses and dental implants. At the end of the studies, this project will validate a

new therapeutic strategy that will prevent or treat both bone infections and periodontal infections. The results of this project will be exploited and disseminated through specific activities, such as events for investors, the scientific community and patients.

PROJECT OBJECTIVE

The objective of ANNAFIB is to improve bone implant osseointegration by preventing the formation of bacterial biofilm using peptide-enriched silk fibrin membranes / sponges (PSF) and nano-functionalized with antimicrobial agents (ANF) that may or may not be used with metallic implants in a surgical procedure, personalized in a single stage, in the case of compound fractures, prosthetic and dental implantology. Silk fiber membranes / sponges enriched with peptides and nano-functionalized with antimicrobial agents (ANF-PSF) will be manufactured and used both as materials to release drugs and as materials that will contribute to regeneration. The main goal is to achieve superior stabilization of the implant due to the double activity of ANF-PSF in the prevention of bone infections and stimulation of osteoinduction. In particular, ANF-PSF could be used as a membrane in infected fractures or periodontitis or loaded into porous metal devices for joint prostheses and dental implants. ANNAFIB will investigate *in vitro* and validate the function and efficacy of ANF-PSF *in vivo*.

Project diagram (taken from the project page, www.annafib.eu)



ESTIMATED RESULTS

The results of ANNAFIB will consist of the development of nano-functionalized antimicrobial membranes with peptide-enriched silk fibrin (ANF-PSF) and of the fully implanted metallic implant devices for orthopedic and dental use that synergistically promote osseointegration and the prevention / treatment of bacterial infections. The action plan and

methodologies make them possible and will provide a new tool to help solve the problem of bacterial infections in two of the most important clinical areas: orthopedics and dentistry.

Establishing a multidisciplinary partnership - which combines a private clinical research institute, public academic and non-academic research institutes and an SME. In addition to achieving the ANNAFIB objectives, we imagined that the partnership established will lay the foundations for future collaborations in the context of translational nanomedicine. Indeed, this consortium encompasses the multidisciplinary competencies needed to move from laboratory to patient. The present project covers two different fields of research: regenerative medicine (bone regeneration and osseointegration) and specific drug delivery systems (antimicrobial agents).

Achieving these two goals will represent a significant breakthrough in the state of the art, where at present a multifunctional but autonomous solution capable of improving bone repair and simultaneously combating microbial infections is lacking.

Another expected result is the integration of disciplines through the active participation of stakeholders representing different societal sectors. The ANNAFIB project will act as a focal point for scientists, engineers and technicians from academia and SMEs, working in the field of nanomaterials development, physical-chemical characterization, *in vitro* and *in vivo* evaluation, familiarization with different approaches. The jointly planned research activities will stimulate interaction and research in the fields of chemistry, materials science, orthopedics, dentistry and biology, stimulating the cooperation of scientists with different experiences and from different countries, aimed at addressing the challenges of the environment and society, developing a sustainable economy.

The planned dissemination activities will increase the visibility of the project on the selected communities and target groups, both at European and international level. In order to maximize the impact, particular attention will be paid to the proximity of specific groups of stakeholders, such as: decision makers (EC, civil and civil society organizations, NGOs, etc.), academics, consultative groups, investors, potential commercial end-users and the general public. The storage of publications will be implemented in an online repository selected through the Open Access Infrastructure for Research in Europe (OpenAIRE) service or the Open Access Deposit Register (ROAR, <http://roar.eprints.org/>).

The Cantacuzino Institute will extend its previous experience on animal models on osteomyelitis, thus consolidating a comprehensive, multidisciplinary experimental platform for future approaches in innovative medicine and / or materials for osteomyelitis therapy.

RESULTS OF THE PROJECT

Article

Bottagisio M, Coman C, Lovati AB. Animal models of orthopaedic infections. A review of rabbit models used to induce long bone bacterial infections. J Med Microbiol. 2019;68(4):506-537.

<https://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.000952#tab2>

Diana – Larisa Ancuța, Cristin Coman, Diana Mihaela Alexandru, Maria Crivineanu. Animal Models Used in Testing the Biocompatibility of the Dental Implant – A Review. Bulletin UASVM Veterinary Medicine 77(2)/2020 <http://dx.doi.org/10.15835/buasv>

<https://journals.usamvcluj.ro/index.php/veterinary/issue/view/403>

Diana-Larisa Ancuța, Teodoru Soare, Diana Soare, Maria Crivineanu, Cristin Coman. Comparative study of osteomyelitis reproduced on rabbits using human strains of methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA) and methicillin-resistant staphylococcus epidermidis (MRSE). Scientific Works Series C. Veterinary Medicine Vol. LXVI, Issue 2, ISSN 2065-1295, 85-92, 2020

http://veterinarymedicinejournal.usamv.ro/pdf/2020/issue_2/Art13.pdf

CONTACT

NMMRDI Cantacuzino

Splaiul Independenței nr. 103, Zip Code 050096, District 5, Bucharest

Phone: +4 021.3069.100

Fax: +4 021.3069.307

Email – office.cantacuzino@mapn.ro

Dr. Coman Cristin

Phone: 0722320012

Email - comancristin@yahoo.com

Denumire proiectului

Nano-funcționalitatea antimicrobiană a matricelor de fibre de mătase îmbogățite cu peptide pentru a preveni infecțiile osoase și pentru a spori osteointegrarea implantului în ortopedie și stomatologie.

Acronim

ANNAFIB

Cuprins

- Obiective an 2019
- Obiective consorțiu
- Obiective INCDMM Cantacuzino
- Rezumatul etapei 2019
- Descrierea științifică și tehnică
- Declarația etică
- Tulpina de MRSE
- Evaluarea reproducerii osteomielitei la iepuri utilizând o tulpină bacteriană de MRSE
- Studiu de osteointegrare al implantului Zimmer Dental Metal
- Concluzii
- Bibliografie
- Scurt raport asupra deplasărilor în cadrul proiectului

Obiective an 2019

Obiective consorțiu :

- Semnarea contractului de cooperare în cadrul consorțiului ;
- Stabilirea studiilor, comunicare, conservare și colectarea datelor;
- Sinteza peptidelor;
- Producerea de implanturi metalice încărcate cu PSF ;
- Crearea Logo-ului proiectului ;
- Crearea paginii de internet a proiectului ;
- Autorizarea proiectelor in vivo ;
- Demararea studiului pilot de inducerea a osteomielitei cu tulpina bacteriană methicilin-resistent *Staphylococcus epidermidis* - MRSE și de osteointegrare a implanturilor în tibia de iepure.

Obiective Institutul Național de Cercetare Dezvoltare Medico-Militară „Cantacuzino,, :

- Semnarea contractului de cooperare în cadrul consorțiului;

- Semnarea contractului de finanțare;
- Întocmirea și semnarea contractelor de muncă pentru cercetătorii din CI participanți la proiect ;
- Întocmirea documentației și a dosarului de evaluarea de către comisia de etică a CI și autorizare de către Direcția Sanitar Veterinară și pentru Siguranța Alimentelor București a studiilor pe animale ;
- Primirea tulpinii de methicillin-resistent *Staphylococcus epidermidis* (MRSE) și revitalizarea ei ;
- Efectuarea studiilor de inducere a osteomielitei cu tulpina MRSE;
- Efectuarea studiului de osteointegrare a implantului dentar Zimmer în tibia de iepure.

Rezumatul etapei 2019

Contractul de cooperare a fost semnat de conducerea CI la sfârșitul lunii iulie 2019, iar cel de finanțare la sfârșitul lunii august 2019. Contractele de muncă pentru cercetătorii participanți la proiect au fost semnate până la data de 15 octombrie 2019, toate obiectivele legate de întocmirea, analiza și semnarea contractelor fiind realizate.

Pentru studiile pe animale s-a întocmit din luna august 2019 dosarul de evaluare și de autorizare conform legislației în vigoare, studiile fiind autorizate de către autoritatea competentă la începutul lunii octombrie.

Coordonatorul proiectului (IOG) a transmis tulpina de MRSE, iar laboratorul de microbiologie al CI a verificat caracteristicile ei, a înmulțit-o și a conservat-o. Tulpina a fost revitalizată cu succes, iar rezultatele au arătat că tulpina are aceleași caracteristici cu cele transmise de către IOG.

Pentru inducerea osteomielitei cu MRSE s-au creat, în aria de experimentare pe animale a CI, 3 loturi de iepuri și s-au încercat 3 concentrații de MRSE – 5×10^5 UFC/ml , 5×10^6 UFC/ml și 5×10^8 UFC/ml. Fiecare lot a fost împărțit în 2 subploturi, unul pentru faza acută și unul pentru faza cronică a bolii. Animalele au fost monitorizate clinic, hematologic, iar la sfârșitul perioadei de evaluare au fost eutanasiate, s-au recoltat probe pentru examenul microbiologic și histologic. Studiul este în faza evaluării examenului histologic unde se va analiza instalarea infecției osoase. Deasemenea se vor crea lame pentru analiza la microscopul de forță atomică biofilmului format. Din observațiile de până acum concentrația de MRSE de 5×10^8 UFC/ml induce osteomielita la peste 80% dintre iepurii inoculați, în faza acută, iar viabilitatea este de peste 75%.

Pentru studiul de osteointegrare s-au primit implanturi Zimmer de la IOG, implanturi simple și implanturi încărcate cu peptide și fibrină (PSF). Pentru realizarea studiului de osteointegrare, în aria de experimentare pe animale a CI, s-a dezvoltat tehnica de implantare a implantului dentar Zimmer pe tibia de iepure. Inițial aceasta s-a efectuat pe tibii recoltate de la animale utilizate în alte studii și eutanasiate, respectând astfel și implementând principiile 3R (replacement, reduction, refinement) ale experimentării pe animale. Deasemenea acest implant inițial ne-a permis și evaluarea pilot la computerul

tomograf. Din păcate, această analiză nu ne permite o evaluare exactă a parametrilor cercetați, respectiv densitatea osoasă și trabeculară, IOG și TAU insistând pe efectuarea unei analize la micro computerul tomograf. De pe platforma de infrastructură de cercetare www.erris.ro am găsit 3 astfel de aparate, însă doar unul este funcțional și cu autorizațiile la zi, însă și la acela nu putem face analizele decât în ianuarie, din lipsa operatorului. După această analiză la microCT urmează evaluare histologică, astfel că până la termenul stabilit de planul proiectului, respectiv martie 2020, vom avea concluziile și la acest studiu.

S-a creat un lot de 5 iepuri, la o tibie am inoculat implantul simplu, la cealaltă implantul cu PSF. Animalele au starea clinică bună. După 60 de zile animalele se vor eutanasia și se va efectua analiza microCT și histologică.

Descrierea științifică și tehnică

Declarația etică

Studiile pe animale au fost avizate favorabil de către comisia de etică a INCDMM Cantacuzino (CI), aviz favorabil nr 351/13.08.2019 și autorizate de către autoritatea competentă, autorizație de proiect nr. 471/02.10.2019. Toate experimentele s-au efectuat cu respectarea normelor de îngrijire și utilizare animalelor folosite în scopuri științifice stabilite de reglementările naționale și europene și aplicarea principiilor 3R. Studiile s-au făcut în INCDMM Cantacuzino, Stațiunea Băneasa, Unitatea de Testare Preclinică (SB), unitate autorizată ca unitate utilizatoare de către autoritatea competentă.

Tulpina de MRSE

Tulpina de MRSE a fost transmisă de către instituția coordonatoare a proiectului, IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi din Milano, Italia (IOG), pe 3 plăci, la începutul lunii octombrie 2019. Laboratorul de microbiologie din CI, a revitalizat-o de pe plăcile pe care a sosit și a analizat-o caracteristicile ei fiind prezentate mai jos :

Tulpina – Staphylococcus epidermidis

Proprietar și cod – Proprietarul tulpinii este IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi din Milano, Italia și tulpina de MRSE are codul GOI1153754-03-14.

Condiții de creștere – Mediu triptic soia agar (TSA) la 37⁰ C, în atmosferă aerobă.

Morfologia coloniilor – Pe TSA, *S. epidermidis* apare ca niște colonii mici (aprox. 1,5 mm), circulare, netede, opace, albe.

Condiții de păstrare - la - 80⁰ C, în mediu BHI cu 10% glicerol.

Izolare și identificare – Tulpina este clinică, de origine umană și a fost recoltată de la un pacient care avea un implant la genunchi, implant ce s-a infectat. Pacientul s-a prezentat pentru refacerea implantului la Centrul de Chirurgie Reconstructivă a Infecțiilor Osteorticulare (CRIO, IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi din Milano, Italia), iar tulpina a fost izolată la Laboratorul de Chimie și Microbiologie Clinică (IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi din Milano, Italia). Identificarea microbiologică s-a făcut la nivel

fenotipic și genotipic. Identificarea fenotipică făcută la un sistem VITEK2 (Biomerieux, Franța) a fost confirmată prin analiza secvențelor (PSQ96RNA, Diatech, Italia) de ADN a regiunilor V1 și V3 a genei 16S rARN. Secvențele amplificate (apr. 60-80 bp) au fost comparate cu secvențele existente în algoritmul BLAST (basic local alignment search tool).

Profilul antimicrobian – Testarea activității antimicrobiene și stabilirea concentrației minime inhibitorii (MIC) s-a efectuat pe sistemul VITEK2 utilizând un card AST632 specific pentru stafilococi.

Rezultatele sunt prezentate în tabelul de mai jos :

Nume antibiotic	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Interpretare_EUCAST
Benzylpenicilină	≥ 0.5	R
Oxacilină	≥ 4	R
Gentamicină	≤ 0.5	S
Levofloxacin	4	R
Eritromicina	≤ 0.25	S
Clindamicina	≤ 0.12	S
Linezolid	1	S
Daptomicina	0.25	S
Teicoplanina	4	S
Vancomicina	≤ 0.5	S
Tetraciclina	≤ 1	S
Tigeciclina	≤ 0.12	S
Acid fusidic	≤ 0.5	S
Rifampicina	≥ 4	R

Antibiograma MRSE

Caracteristici genetice – Secvențele de genom ale tulpinii MRSE, GOI1153754-03-14, sunt depozitate în Banca Internațională de Gene - DDBJ/ENA/GenBank.

Factorii de virulență :

- Coagulază – negativ
- NaCl – tolerant la creștere pe manitol –sare-agar
- Formare de biofilm – controlată de expresimare adeziunilor intercelulare ale polizaharidelor (PIA) codificate de genele reglatoare icaADBC și icaR.

În cadrul laboratorului de microbiologie au fost pregătite concentrațiile de MRSE utilizate în studiile epe animale, respectiv 5×10^5 UFC/ml , 5×10^6 UFC/ml și 5×10^8 UFC/ml.

Evaluarea reproducerii osteomielitei la iepuri utilizând o tulpină bacteriană de MRSE

Inițial acest studiu nu era prevăzut în cadrul proiectului însă datorită faptului că CI nu are experiență decât în reproducerea osteomielitei cu tulpini ATCC și methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), iar MRSE nu este o tulpină foarte patogenă pentru iepure și MRSE ce se utilizează în proiect este de origine umană, subsemnatul a solicitat

efectuarea unui studiu pilot pentru stabilirea concentrației de MRSE care induce osteomielite la iepure.

Concentrațiile de MRSE utilizate în studiile pe animale, respectiv 5×10^5 UFC/ml , 5×10^6 UFC/ml și 5×10^8 UFC/ml, au fost stabilite pe baza experienței proprii și a recomandării coordonatorului studiului. Nu există literatură cu privire la inducerea osteomielitei la iepure cu MRSE.

Acest studiu a fost efectuat având la bază Standardul Internațional OECD de Bună Practică de Laborator (GLP) - ENV/MC/CHEM(98)17.

Animale

- Specie/Tulpina: Iepuri/New Zealand White.
- Sursa: Crescătoria de animale de laborator – Institutul „Cantacuzino” (INCDMM Cantacuzino).
- Sex: Masculi și femele
- Interval greutate corporală peste 2500 grame în momentul începerii testării.
- Vârsta: tineret - adult, minim 6 luni.
- Perioada de aclimatizare: minim 5 zile.
- Număr de animale total: 30
- Metoda de identificare:
 - pentru animale – marcaj pe ureche.
 - pentru custi – eticheta.

Managementul animalelor

- Toate aspectele legate de îngrijire a animalelor și cazare au fost în conformitate cu ISO 10993-2.
- Spațiul de experimentare: Condiții conform Procedurilor Standard INCDMM Cantacuzino.
- Hrănire: Animale au fost alimentate cu furaj peletat standardizat, *ad libitum*. Furajul nu conține contaminanți cunoscuți care să interfereze cu rezultatele testului. Datele despre furaj sunt arhivate la INCDMM Cantacuzino.
- Apa: Animale au fost alimentate cu apă potabilă, *ad libitum*. Apa nu conține contaminanți cunoscuți care să interfereze cu rezultatele testului. Analiza periodică a apei este efectuată, iar rezultatele sunt arhivate la INCDMM Cantacuzino.
- Cazare: Animalele au fost adăpostite în grupuri în cuști de inox individuale identificate printr-o etichetă care indică, sexul animalelor, lotul de test, ID animal, procedura experimentală (lista intervenție asupra animalului).
- Microclimat: Temperatura camerei a fost monitorizată zilnic și menținută în intervalul 18 - 24°C. Umiditatea camerei a fost monitorizată zilnic și menținută în intervalul 35-75%. Ciclul de lumină este controlat pentru a se menține un ritm de 12 ore lumină/12 ore întuneric.
- Acreditări: Unitatea de testare INCDMM Cantacuzino este autorizată de către Direcția Sanitar Veterinară București prin Autorizația Sanitar Veterinară nr. 426/29.10.2018.
- Proiectul a fost avizat favorabil de către comisia de etică a INCDMM Cantacuzino, aviz CE 351/13.08.2019 și aprobat de către DSVSA București, Nr 471/02.10.2019
- Personal: Pentru aceasta testare a fost utilizat un personal calificat și instruit corespunzător.
- Selecție: Doar animale sănătoase, care nu au mai fost folosite în testări anterioare au fost selectate.

Schema de lotizare

Au fost create 3 loturi de animale și pentru fiecare dintre loturi au fost create 3 subloturi:

Lot	Animale pe lot	Proceduri de efectuat
1 a	5	Lot inoculat cu MRSE, conc 5×10^5 UFC/ml – si urmărit instalarea formei acute de boală
1 b	5	Lot inoculat cu MRSE, conc 5×10^5 UFC/ml – si urmărit instalarea formei cronice de boală
2 a	5	Lot inoculat cu MRSE, conc 5×10^6 UFC/ml – si urmărit instalarea formei acute de boală
2 b	5	Lot inoculat cu MRSE, conc 5×10^6 UFC/ml – si urmărit instalarea formei cronice de boală
3 a	5	Lot inoculat cu MRSE, conc 5×10^8 UFC/ml – si urmărit instalarea formei acute de boală
3 b	5	Lot inoculat cu MRSE, conc 5×10^8 UFC/ml – si urmărit instalarea formei cronice de boală

Schema de lotizare

Lotizarea s-a făcut conform procedurii interne de lotizare a facilității de testare (INCDMM Cantacuzino).

Metoda de lucru

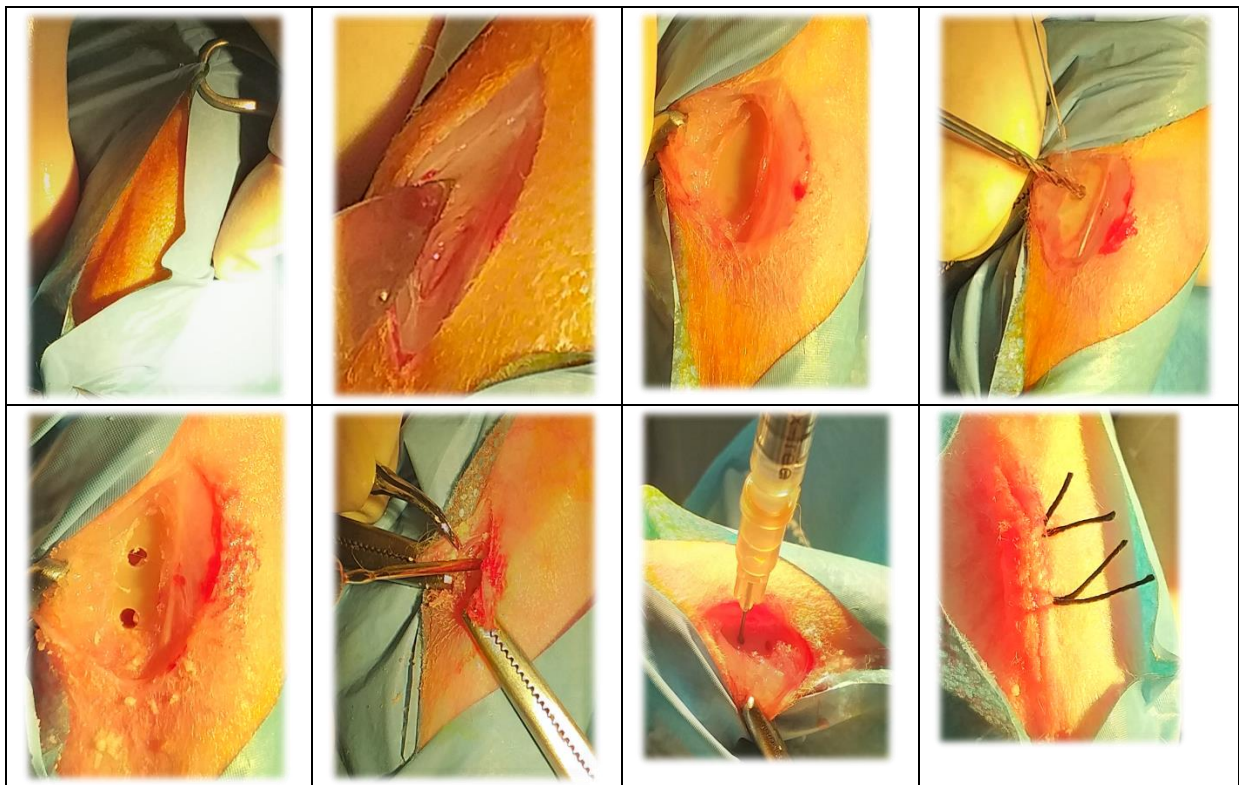
a. Crearea defectelor osoase

Pe iepurii anesteziati total s-au realizat în tibia piciorului stâng a fiecărui animal doua defecte osoase de 1 mm diametru. Câmpul operator a fost pregătit preoperator, s-a realizat antisepsia cu iod 2% și au fost folosite de asemenea câmpuri pentru a crea un domeniu steril. Incizia a fost practică la nivelul pielii și țesutului subcutanat, iar corticala osoasă a fost expusă prin intermediul disecției boante. Apoi, s-a incizat periostul, decolându-l de pe suprafața osoasă. Corticala osoasa a tibiei a fost apoi expusă. Folosind un burghiu de 1 mm s-au creat 2 defecte osoase la distanțe de aproximativ 10 mm între ele și la apr. 15 mm de articulația femuro-tibio-rotuliană, până în cavitatea medulară, rezultând 2 geode de 1 mm diametru. Imediat postoperator timp de 3 zile s-a făcut un tratament cu analgezice la toți iepurii.

b. inocularea MRSE

În defectele osoase create s-au introdus 2 meșe de bumbac imersate în prealabil în suspensia bacteriană peste care s-a inoculat câte 0,05 ml de soluție de MRSE în fiecare defect osos, în concentrațiile corespunzătoare fiecărui lot. S-a avut grijă ca soluția să fie inoculată doar în defectul osos. Operația s-a închis prin practicarea suturii în 2-3 puncte separate folosind fir neresorbabil. Peste plaga astfel închisa s-a aplicat un strat protector de aluminiu medical, comprese sterile și pansament tip Pet-Flex.

Tehnica chirurgicală este evidențiată în figura de mai jos



Tehnica de inoculare a bacteriei MRSE

Monitorizarea animalelor si a evolutiei bolii

Monitorizarea animalelor a durat in total 30 de zile (diferențiată pe subloturi) si s-a facut prin:

Examinare clinica zilnică a stării de sănătate generale si locale

- S-au urmarit semne locale de inflamație, abcese care supurează spontan și se vindecă, umflături, eritem.
- Cantarire saptamanala la toate animalele.
- Examen hematologic.

Examen microbiologic – la 15 și 30 de zile

Examen necropsic: la toate animalele moarte in timpul experimentului și cele eutanasiate în timpul studiului și la datele stabilite.S-au facut examinari ale tibiei inoculate si a diferitelor tesuturi ce prezentau modificari vizibile macroscopic

Monitorizare histologică – în curs.

Rezultate

Procentul de supraviețuire : în acest experiment s-a înregistrat un procent de supraviețuire de 100% la toate loturile.

Analiza semnelor clinice făcute prin observație și constatate in timpul experimentului evidentiaza urmatoarele:

Lot 1 – fără semne clinice

Lot 2 - 3 iepuri au prezentat abcese la aproximativ 7 zile de la inducerea bolii, abcese ce s-au mentinut in diferite forme (supurative sau incapsulate) aproximativ 30 de zile de la operatie ; 2 iepuri au prezentat plaga deschisa la aproximativ 6 zile de la momentul inocularii.

Lot 3 – 5 iepuri au prezentat abcese la aproximativ 7 zile de la inducerea bolii, abcese ce s-au mentinut in diferite forme (supurative sau incapsulate) tot studiul. 2 iepuri au prezentat diaree la 2 zile de la inoculare.

Greutatea corporală s-a monitorizat prin cântărirea animalelor pe un cântar RADWANG.

Evoluția greutății corporale a fost cea prezentată în tabelul de mai jos.

Lot	Ziua experimentului	Greutatea corporală medie (în grame)
Lot 1	Z 0	2831,61
	Z 14	2765,62
	Z 30	2708,35
Lot 2	Z 0	3190,90
	Z 14	2892,68
	Z 30	2714,65
Lot 2	Z 0	3109,22
	Z 14	2754,23
	Z 30	2724,33

Tabel 3 – Greutatea corporală

Temperatura corporala s-a masurat folosind un termometru digital, prin introducerea în rect, zilnic în primele 10 zile și apoi săptămânal. Rezultatele sunt următoarele:

Nr. Lot	Z1	Z2	Z3	Z4	Z6	Z7	Z8	Z9	Z10	Z14	Z30
1	40,24	39,27	39,55	38,82	37,8	38,26	39,55	39,46	39,11	39,66	38,68
2	40,23	40,06	39,76	38,69	37,78	38,6	38,66	39,23	38,66	38,81	37,33
3	41,23	41,44	40,05	40,15	39,8	38,98	39,09	39,90	40,01	38,25	38,76

Temperatura corporală

Analizele hematologice s-au făcut pe un aparat Idexx Procyte 5 Diff, din sânge recoltat pe EDTA. Rezultatele sunt următoarele:

Parametru determinat	Z 0			Z 14			Z 30			Valori de referință aparat
	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 1	Lot 2	Lot 3	
RBC 10 ¹² /L	5.18	5.22	5.29	4.56	4.11	4.67	5.80	5.6	5.27	4.62-5.96
HCT %	33.63	33.13	33.12	30.55	25.83	31.13	34.76	37.15	36.13	40-50
HGB g/dL	11.09	11.09	12.08	9.85	8.06	11.09	11.43	11.7	16.09	13.3-16.7
MCV fL	64.97	63.34	63.44	67	62.9	62.34	59.76	66.35	67.34	46.0-72.0
MCH pg	21.4	21.20	21.98	21.6	19.46	19.20	19.66	20.9	23.20	15.0-19.0
MCHC g/dL	32.93	33.5	33.11	32.25	30.96	33.59	32.9	31.55	33.58	32.7-34.9
RDW %	15.42	15.04	16.21	16.1	18.26	13.04	20.66	16.1	15.4	-
RETIC %	3.04	2.69	2.72	5.1	6.366	1.69	2.3	2	2.69	-
RETIC K/μL	159.04	139.93	140.51	232.75	244.6	245.76	133.66	106.35	149.93	81.7-231.0
WBC 10 ⁹ /L	6.84	6.66	6.77	7.16	10.366	12.34	14.25	7.185	12.66	3.27-11.14
NEU %	23.17	24.56	22.22	38.65	41.16	44.56	52.26	59.5	24.56	-
LYM %	65.190	62.58	64.42	41.5	32.366	32.58	34.43	30.7	42.58	-
MONO %	5.554	7.0266	6.66	11.9	21.93	18.91	8.76	5.7	7.66	-
EOS %	1.40	1.173	1.1	1.4	1.066	1.13	0.9	1	1.73	-
BASO%	4.672	4.653	4.61	6.55	3.46	4.53	3.633	3.1	4.63	-
HETERO 10 ⁹ /L	1.58	1.636	1.88	2.85	4.32	1.63	9.70	4.16	1.66	1.31-5.01
LYM 10 ⁹ /L	4.47	4.169	4.91	2.905	3.22	4.19	2.83	2.31	4.19	1.96-9.47
MONO 10 ⁹ /L	0.373	0.469	0.65	0.83	2.34	0.69	1.22	0.415	0.44	0.00-1.11
EOS 10 ⁹ /L	0.098	0.079	0.1	0.1	0.11	0.07	0.11	0.075	0.1	0.00-0.22
BASO 10 ⁹ /L	0.31	0.308	0.31	0.475	0.36	0.32	0.376	0.225	0.38	0.00-0.01
PLT K/μL	137.63	183.8	165.8	440.5	667.66	564.32	464.33	292.5	283.8	300-700
MPV fL	6.5	6.54	6.12	6.7	6.66	6.54	7.133	7.2	6.54	-
PDW fL	6.13	6.33	7.45	6.5	6.6	6.33	7.166	7	6.63	-

PCT %	0.093	0.120	0.079	0.295	0.44	0.110	0.33	0.205	0.208	-
-------	-------	-------	-------	-------	------	-------	------	-------	-------	---

Rezultate hematologice

Examenul microbiologic a fost efectuat pe probe de țesut medular recoltat de la nivelul tibiei, pe probe de sânge în vederea identificării MRSE prin hemocultură și pe probe recoltate de la nivelul diferitelor organe ce prezentau leziuni macroscopice.. Rezultatele în urma analizei probelor sanguine au arătat că MRSE a fost prezent în sânge în primele 14 zile post inoculare doar la lotul 3, la sfârșitul experimentului nemaifiind identificat.

Rezultate în urma examinării MALDI TOF

LOT	Sublot	Probă examinată	Microorganism identificat	
			15zile post inoculare	30zile post inoculare
1	a	Țesut medular de la nivelul tibiei	Neidentificat	-
	b		-	Neidentificat
2	a	Țesut medular de la nivelul tibiei	Neidentificat	-
	b		-	Neidentificat
3	a	Țesut medular de la nivelul tibiei	MRSE – 4 iepuri	-
	b		-	MRSE – 1 iepure

Rezultatele examenului microbiologic

Examinarea necropsică s-a efectuat la iepurii eutanasiati conform protocolului de studiu.

Lotul 1: Fără modificări macroscopice

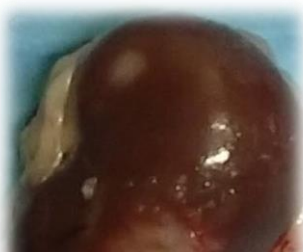
Lotul 2 : Abscese renale la 4 iepuri si congestie renala la 2 iepuri.

Lotul 3: Examenul necropsic a evidențiat existența leziunilor la nivelul tibiei operate și în organe, astfel au putut fi observate modificări macroscopice în special la nivelul aparatului cardio-respirator, la nivel renal, splenic și muscular.

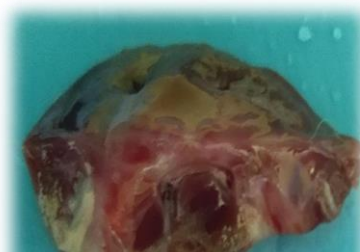
Mai jos sunt prezentate fotografiile de la leziunile observate



Degenerare cardiacă



Infarct renal



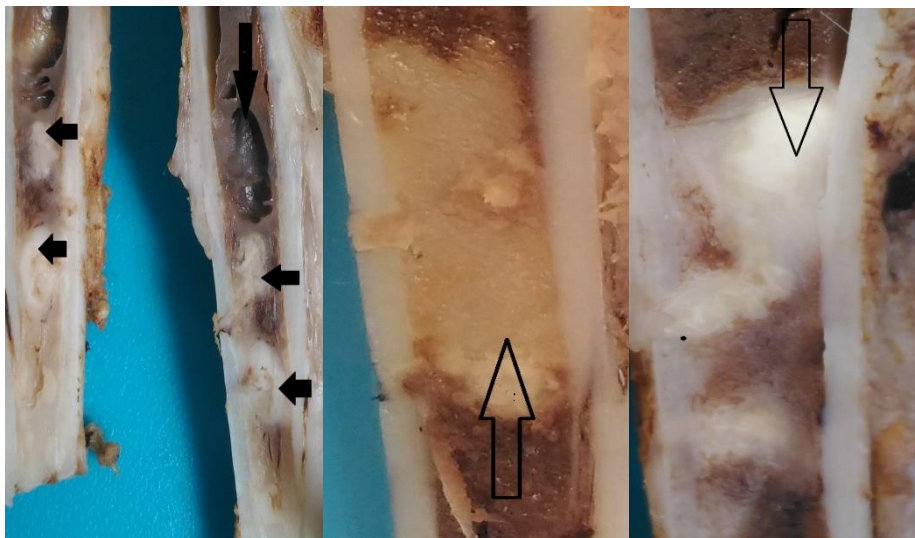
Necroză musculară

Lot 3 – leziuni necropsice

Organe cu modificări macroscopice

Examen histopatologic –in curs

Dupa decalcifiere s-au facut la iepurii de la lotul 3, la care s-a observat leziuni necropsice o secțiune longitudinală, înainte de tăiere și colorare, constatându-se leziuni la nivelul tibiei.



Secțiuni longitudinale prin tibiile afectate

Tibii cu modificări macroscopice

Rata de supraviețuire a fost de 100% la toate loturile.

Analiza semnelor clinice a certificat existența de leziuni doar la 2 loturi, mai pregnant la lotul 3, inoculat cu cea mai mare concentrație de MRSE.

Temperatura a fost ridicată în primele zile, apoi ca medie a intrat pe un palier normal.

Greutatea corporală a fost în scădere în primele 7 zile de după inoculare, iar apoi s-a menținut în platou.

Rezultatele de la *analizele hematologice* sunt inconsistente și lipsite de relevanță statistică. Valorile obținute se încadrează în valorile de referință ale aparatului de analizat, iar diferențele între loturi nu sunt relevante.

Analizele microbiologice evidențiază identificarea bacteriei doar la lotul 3 și la mai mulți iepuri (aproximativ 80%) la faza acută.

Analiza histologică este în curs.

Concluzionând putem spune că s-au observat semne clinice și rezultate microbiologice doar la concentrația de 5×10^8 UFC/ml. În funcție de rezultatele histologice și ale biofilmului se va decide dacă vom folosi concentrația aceasta sau vom mai mari concentrația.

Studiu de osteointegrare al implantului Zimmer Dental Metal

Materiale și metode:

- 5 Iepuri, cu vârsta peste 6 luni, greutate de 2,5-3 kg, masculi și femele
- 5 implanturi trabeculare TMMB10
- 5 implanturi trabeculare TMMB10 + PSF



Implant trabecular Zimmer TMMB10

- Fabricat dintr-un aliaj de Titan –Aluminiu, iar zona trabeculară din Tantal
- Formă conică cu fir triplu de plumb
- Suprafața secțiunii de implant este tratată pentru a facilita osteointegrarea
- 10 mm lungime, diametru 3,7mm

Prima dată s-a făcut o implantare pe o tibie *ex vivo*. S-au încercat două modalități de implantare, fiind aleasă pe baza discuțiilor cu colegii din consorțiu cea în care implantul traversa tibia și venea în contact cu ambele zone corticale (figura b).

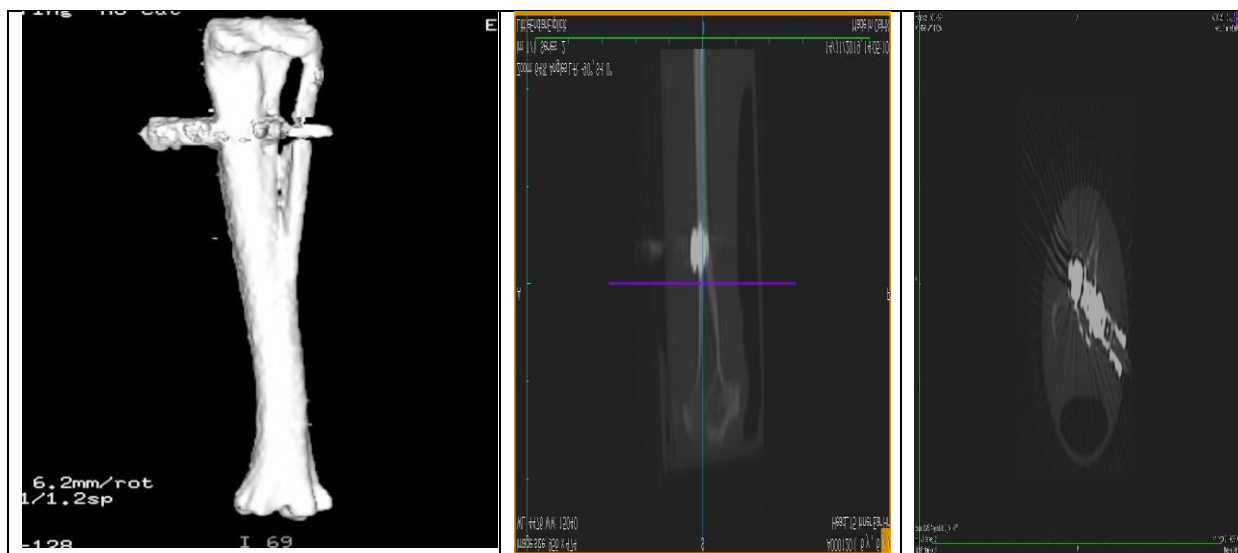


Figura 6a – Implantare pe o singură parte a tibiei



Figura 6b – Implantare pe ambele părți ale tibiei

Pe proba b s-a făcut și examenul CT, rezultatele arătând că implantul se poate integra, însă nu se pot analiza foarte bine parametrii osteointegrării, respectiv densitatea osoasă, densitatea trabeculară etc.



Imagini de la Computer Tomograf

Tehnica de implantare

S-au selectat 5 iepuri tineret, Noua Zeelandă masculi și femele, 2-3 kg., în momentul începerii studiului. Animalele s-au individualizat și au format un lot.

Proceduri efectuate

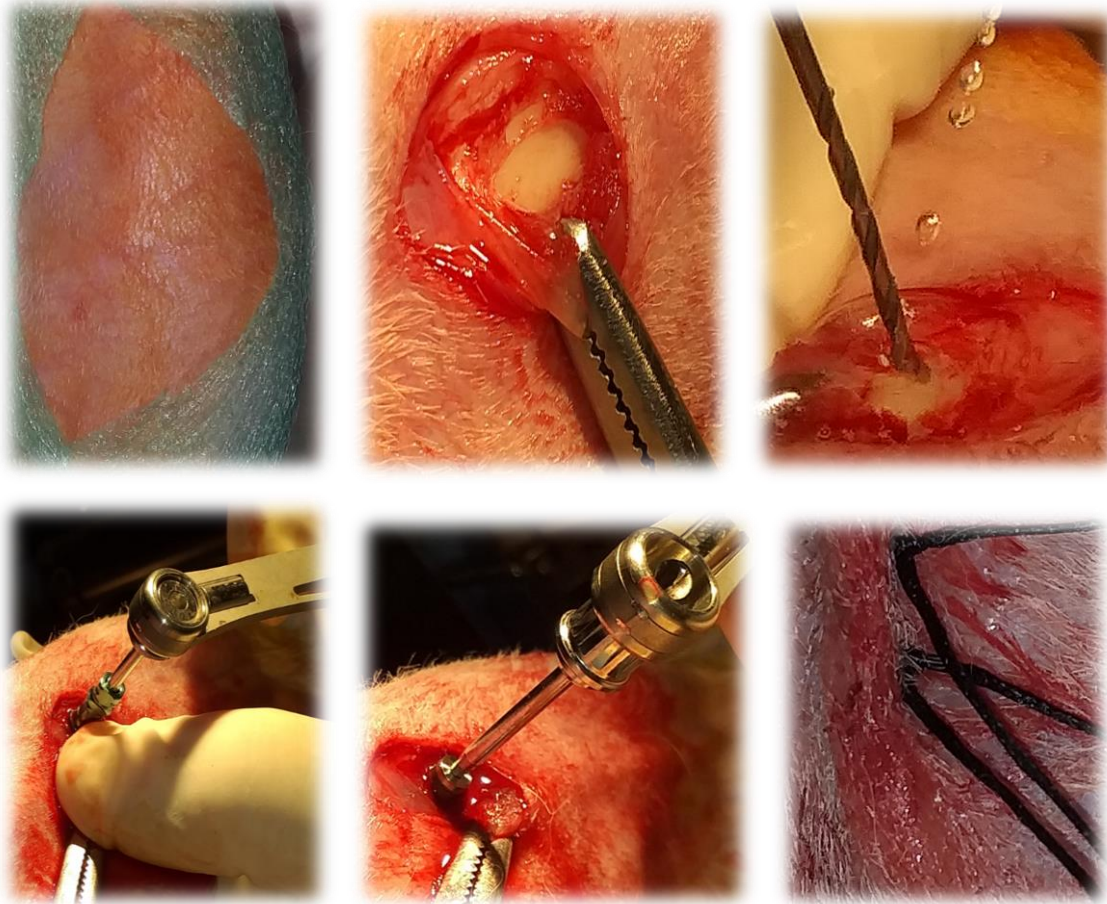
Operațiile premergătoare inoculărilor sunt identice cu cele de la inducerea osteomielitei.

Membrul posterior stâng: s-a creat o cavitate la nivelul tibiei, în mod progresiv, folosind burghiu de 1mm, 1,5mm, 2mm, 2,5 mm, 3mm și 3,5mm. Întreg procesul de creare a cavității s-a realizat sub răcire cu apă pură, în jet continuu. S-a înfiletat implantul trabecular TMMB10 în cavitate, apoi s-a detașează capătul de fixare și s-a montat șurubul de cicatrizare. Plaga s-a suturat în 2-3 puncte separate peste care s-a aplicat un strat protector de aluminiu, compresă sterilă și pansament tip PetFlex.

Membrul posterior drept: la fel ca la celălalt picior, doar că s-a pus implantul trabecular TMMB10 +PSF în cavitate.

Post operator: tratament cu antibiotic (Enrofloxacină 5mg/kg, 5 zile) și antiinflamator (Ketofen 3mg/kg, 5 zile).

Operația este sintetizată în fotografiile de mai jos



Operația de implantare

La 14 zile s-a făcut un examen radiologic care a arătat reușita operației



Examen radiologic la 14 zile de la implantare

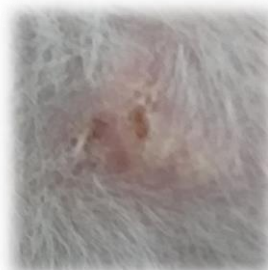
De asemenea monitorizarea clinică evidențiază că procesul de vindecare decurge normal.



7 zile



14 zile



21 zile

Evoluția clinică a leziunilor la nivelul implantului

Urmează ca în luna ianuarie 2020 animalele să fie eutanasiate, iar la tibii să se efectueze examenul microCT, histopatologic și evaluarea osteointegrării. Menționez că pentru efectuarea examenului histologic colegii din consorțiu au solicitat ca piesele să fie prelucrate prin includerea în rășină și tăierea cu un dispozitiv special, fără scoaterea implantului, însă deoarece în România nu există un astfel de echipament au fost de acord cu efectuarea tehnicii clasice respectiv: demineralizare, includere în parafină, scoaterea implantului, colorare cu hematoxilina-eozină.

Rezultatele preliminare indică o osteointegrare a implantului însă aceasta trebuie confirmată prin evaluări ulterioare.

Concluzii

1. Studiile pe animale s-au efectuat după autorizarea lor de către autoritatea competentă.
2. Tulpina de MRSE ce se va utiliza în studii a fost evaluată și caracterizată.
3. Studiul de inducere a osteomielitei cu tulpina MRSE a arătat că la concentrația de 5×10^8 UFC/ml se reproduce osteomielita. Rămâne ca analizele histologice și ale biofilmului să confirme concentrația.
4. Pentru studiul de osteointegrare s-a dezvoltat tehnica chirurgicală și s-a făcut implantarea. Osteointegrarea se va evalua după efectuarea examenului microCT și histologic.

Bibliografie

1. Bottagisio, M., Soggiu, A., Lovati, A. B., Toscano, M., Piras, C., Romanò, C. L., Bonizzi L., Roncada P., Drago, L. (2017). Draft genome sequence of *Staphylococcus epidermidis* clinical strain GOI1153754-03-14 isolated from an infected knee prosthesis. *Genome Announcements*, 5(20). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00378-17>.
2. OECD - ISO 10993-2, Biological evaluation of medical devices Part 2: Animal welfare requirements, 2016.
3. LEGEA nr. 43 din 11 aprilie 2014 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice, actualizată, 2019.
4. Masters EA, Trombetta RP, de Mesy Bentley KL1, Boyce BF, Gill AL, Gill SR, Nishitani K1, Ishikawa M, Morita Y, Ito H, Bello-Irizarry SN, Ninomiya M, Brodell JD Jr, Lee CC, Hao SP, Oh I, Xie C, Awad HA, Daiss JL1, Owen JR, Kates SL, Schwarz EM, Muthukrishnan G. Evolving concepts in bone infection: redefining “biofilm” “acute vs. chronic osteomyelitis” “the immune proteome” and local antibiotic therapy. *Bone Res.* 2019; (15)7:20.
5. Coman C, Surdu-Bob C, Turcu D, Vlase E, Oporanu M, Badulescu M. Evaluarea clinică și microbiologică a unui model de osteomieliță umană. *Rev. Rom. Med. Vet.* 2013; 2: 65-72.
6. Bottagisio M, Coman C, Lovati AB. Animal models of orthopaedic infections. A review of rabbit models used to induce long bone bacterial infections. *J Med Microbiol.* 2019;68(4):506-537.
7. Zohra Khatoon, Christopher D. McTiernan, Erik J. Suuronen, Thien-Fah Mah, Emilio I. Alarcon. Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon* 4 (2018) e01067. doi: 10.1016/j.heliyon.2018.e01067.
8. Ramasamy M, Lee J. Recent Nanotechnology Approaches for Prevention and Treatment of Biofilm- Associated Infections on Medical Devices Recent Nanotechnology Approaches for Prevention and Treatment of Biofilm-Associated Infections on Medical Devices. *Biomed Res. Int.* (2016:1851242.) (2016).
9. Shah SR, Tataru AM, D’Souza RN, Mikos AG, Kasper FK. Evolving strategies for preventing biofilm on implantable materials. *Mater. Today.* 16(5), 177–182 (2013).
10. Lovati AB, Lopa S, Ô GT, et al. In vivo evaluation of bone deposition in macroporous titanium implants loaded with mesenchymal stem cells and strontium-enriched hydrogel. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 103(2) (2015).
11. Lovati AB, Bottagisio M, Vecchi E De, Gallazzi E, Drago L. Animal models of implant-related low-grade infections. A twenty-year review. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology.* (2017).
12. Lovati AB, Romanò CL, Bottagisio M, et al. Modeling *staphylococcus epidermidis*-induced non-unions: Subclinical and clinical evidence in rats. *PLoS One.* 11(1) (2016).
13. Lovati AB, Drago L, Bottagisio M, et al. Systemic and Local Administration of Antimicrobial and Cell Therapies to Prevent Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* -Induced Femoral Nonunions in a Rat Model. *Mediators Inflamm.* 2016 (2016).
14. Surdu-Bob CC, Coman C, Barbuceanu F, Turcu D, Berbaru N, Badulescu M. The influence of foreign body surface area on the outcome of chronic osteomyelitis. *Med. Eng. Phys.* 38(9), 870–876 (2016).

15. Artzi Z, Nemcovsky CE, Tal H, Kozlovsky A. Timing of Implant Placement and Augmentation with Bone Replacement Material: Clinical Assessment at 8 and 16Months. *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* 15(1), 121–129 (2013).
16. Lovati AB, Romanò CL, Bottagisio M, et al. Modeling staphylococcus epidermidis-induced non-unions: Subclinical and clinical evidence in rats. *PLoS One.* 11(1) (2016).
17. Shon W-J, Chung SH, Kim H-K, Han G-J, Cho B-H, Park Y-S. Peri-implant bone formation of non-thermal atmospheric pressure plasma-treated zirconia implants with different surface roughness in rabbit tibiae. *Clin. Oral Impl. Res.* 25, 2014, 573–579. doi: 10.1111/clr.12115.
18. David Reinedahl, Silvia Galli, Tomas Albrektsson, Pentti Tengvall, Carina B. Johansson, Petra Hammarström Johansson, Ann Wennerberg. Aseptic Ligatures Induce Marginal Peri-Implant Bone Loss—An 8-Week Trial in Rabbits. *J. Clin. Med.* 2019, 8, 1248; doi:10.3390/jcm8081248.
19. Jun-Beom Lee, Ye-Hyeon Jo, Jung-Yoo Choi, Yang-Jo Seol, Yong-Moo Lee, Young Ku, In-Chul Rhyu, In-Sung Luke Yeo. The Effect of Ultraviolet Photofunctionalization on a Titanium Dental Implant with Machined Surface: An In Vitro and In Vivo Study. *Materials* 2019, 12, 2078; doi:10.3390/ma12132078.
20. Sergio Alexandre Gehrke, Tiago Luis Eliers Treichel, Letícia Pérez-Díaz, Jose Luis Calvo-Guirado, Jaime Aramburú Júnior, Patricia Mazón, Piedad N. de Aza. Impact of Different Titanium Implant Thread Designs on Bone Healing: A Biomechanical and Histometric Study with an Animal Model. *J. Clin. Med.* 2019, 8, 777; doi:10.3390/jcm8060777

SCIENTIFIC REPORTING 2019

PROJECT NAME

Antimicrobial Nano-Functionalization of Peptide-enriched Silk Fibroin matrices to prevent bone infections and to enhance implant osseointegration in orthopedics and dentistry.

ACRONIM

ANNAFIB

Content

Name

Objectives for 2019

Consortium objectives

Objectives of INCDMM Cantacuzino

Summary of the 2019 stage

Scientific and technical description

Ethical statement

MRSE strain

Evaluation of osteomyelitis reproduction in rabbits using a bacterial strain of MRSE

Osteointegration study of the Zimmer Dental Metal implant

Conclusions

Bibliography

Objectives for 2019

Consortium objectives :

- Signing the cooperation contract within the consortium ;
- Establishment of studies, communication, conservation and data collection;
- Peptide synthesis;
- Production of metal implants loaded with PSF;
- Creating the project logo;
- Creation of the website of the project;
- In vivo project authorization;
- Starting the pilot study for the induction of osteomyelitis with the methicillin-resistant bacterial strain *Staphylococcus epidermidis* - MRSE and for the osseointegration of the implants in the rabbit tibia.

Objectives of the National Institute for Medical-Military Development Research ,, Cantacuzino ,,:

- Signing the cooperation contract within the consortium;
- Signing the financing contract;
- Preparation and signing of employment contracts for CI researchers participating in the project;
- The documentation for the studies assessment of the CI ethical committee and authorization by the Department of Veterinary and Food Safety Bucharest;
- Receiving the methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE) strain and revitalizing it;
- Performing osteomyelitis induction studies with MRSE strain;
- Making the study of osseointegration of the dental implant in the tibia of rabbits Zimmer.

Summary of the 2019 stage

The cooperation contract was managed by the CI management at the end of July 2019, and the financing contract at the end of August 2019. The employment contracts for the researchers participating in the project were signed until October 15, 2019, all objectives related to preparation, analysis and signing of contracts being performed.

For the animal studies, the evaluation and authorization file was prepared from August 2019 according to the legislation in force, the studies being authorized by the competent authority at the beginning of October.

Project Coordinator (IOG) sent MRSE strain to the microbiology laboratory of the CI to verify its characteristics, and to multiply it by a conserved. The strain was successfully revitalized, and the results showed that the strain has the same characteristics as those transmitted by the IOG.

For the induction of osteomyelitis with MRSE they were created, in the area of animal testing of CI, three groups of rabbits, and have tried three concentrations of MRSE - 5×10^5 UFC/ml , 5×10^6 UFC/ml și 5×10^8 UFC/ml.

Each group was split into two groups, one for the acute phase and a chronic phase of the disease. The animals were monitored clinically, hematologically, and at the end of the evaluation period they were euthanized, samples were collected for microbiological and histological examination. The study is in the evaluation phase of the histological examination where the installation of the bone infection will be analyzed. Samples will also be created for analysis under the atomic force microscope of the formed biofilm.

From the observations so far, the MRSE concentration of 5×10^8 CFU / ml induces osteomyelitis in over 80% of the inoculated rabbits, in the acute phase, and the viability is over 75%.

Zimmer implants from IOG, simple implants and peptide and fibrin (PSF) loaded implants were also received for the osseointegration study. In order to carry out the osseointegration study, in the area of animal experimentation of CI, the technique of implantation of the Zimmer tentative implant on the rabbit tibia was developed. Initially the study was made on tibia collected from the animals used in the other study and euthanized, thus implementing compliance with the principles of 3R (replacement, reduction, refinement) from animal experimentation. This initial implant also allowed us to evaluate the CT scan on the computer. Unfortunately, this analysis does not allow us an exact evaluation of the researched parameters, respectively the bone and trabecular density, IOG and TAU insisting on performing an analysis on the microcomputer tomograph.

From the research infrastructure platform www.erris.ro we found 3 such devices, but only one is functional and with up-to-date authorizations, but we cannot do the analyzes until January, due to the lack of the operator. After this analysis at microCT follows histological evaluation, so that by the deadline set by the project plan, respectively March 2020, we will have the conclusions of this study as well.

A group of 5 rabbits was created; in one tibia we inoculated the simple implant, in the other the implant with PSF. The animals are in good clinical condition. After 60 days the animals will be euthanized and microCT and histological analysis will be performed.

Scientific and technical description

Ethical statement

The animal studies were approved favorably by the ethics commission of Cantacuzino Institute (CI), act no. 351 / 13.08.2019 and authorized by the competent authority, project authorization no. 471/02. 10.2019. All experiments were performed in compliance with the rules of care and use of animals used for scientific purposes established by national and European regulations and the application of 3R principles. The studies were performed in CI, Băneasa Animal Facility, Preclinical Testing Unit (SB), a unit authorized as a user unit by the competent authority.

MRSE strain

The MRSE strain was transmitted by the project coordinating institution, IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi in Milan, Italy (IOG), on 3 plates, at the beginning of October 2019. Laboratory of Microbiology of the CI, revitalized a plate to which it arrived and examined its characteristics are listed below:

Strain - Staphylococcus epidermidis

Owner and code - The owner of the strain is IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi from Milan, Italy and the MRSE strain has the code GOI1153754-03-14.

Growing conditions - Soybean agar triptych medium (TSA) at 37⁰ C, in an aerobic atmosphere.

Colony morphology - On TSA, S. epidermidis appears as small colonies (approx. 1.5 mm), circular, smooth, opaque, white.

Storage conditions - at - 80⁰ C, in BHI medium with 10% glycerol.

Isolation and identification - The strain is clinical, of human origin and was collected from a patient who have a knee implant, an implant that became infected. This patient presented for restoring implant at Center Reconstructive Surgery of Osteorticulare Infections and Disclosures (CRIO, IRCCS Istituto orthopedic Galeazzi Milan, Italy), and the strain has been isolated at the Laboratory of Chemistry and Clinical Microbiology (IRCCS Istituto orthopedic Galeazzi in Milan, Italy).

Microbiological identification was done at phenotypic and genotypic level. The phenotypic identification made on a VITEK2 system (Biomérieux, France) was confirmed by DNA sequence analysis (PSQ96RNA, Diatech, Italy) of the V1 and V3 regions of the 16S rRNA gene. The amplified sequences (approx. 60-80 bp) were compared with the existing sequences in the BLAST algorithm (basic local alignment search tool).

Antimicrobial profile - Testing of antimicrobial activity and determination of minimum inhibitory concentration (MIC) was performed on the VITEK2 system using an AST632 card specific for staphylococci.

The results are presented in the table below:

Antibiotic	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	EUCAST Interpretation
Benzylpeniciline	≥ 0.5	R
Oxaciline	≥ 4	R
Gentamicine	≤ 0.5	S
Levofloxacin	4	R
Eritromicine	≤ 0.25	S
Clindamicine	≤ 0.12	S
Linezolid	1	S
Daptomicine	0.25	S
Teicoplanine	4	S
Vancomicine	≤ 0.5	S
Tetraciline	≤ 1	S
Tigecicline	≤ 0.12	S
Fusidic acid	≤ 0.5	S
Rifampicine	≥ 4	R

Genetic characteristics - The genome sequences of the MRSE strain, GOI1153754-03-14, are deposited in the International Gene Bank - DDBJ / ENA / GenBank.

Virulence factors :

- Coagulase - negative
- NaCl - growth tolerant on mannitol - salt-agar
- Biofilm formation - controlled by the expression of intercellular adhesions of polysaccharides (PIA) encoded by the regulatory genes *icaADBC* and *icaR*.

In the microbiology laboratory, the concentrations of MRSE used in animal studies were prepared, respectively 5×10^5 CFU / ml, 5×10^6 CFU / ml and 5×10^8 CFU / ml.

Evaluation of osteomyelitis reproduction in rabbits using a bacterial strain of MRSE

Initially this study was not foreseen in the project but due to the fact that CI has experience only in the reproduction of osteomyelitis with ATCC strains and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), and MRSE is not a very pathogenic strain for rabbit and MRSE used in project is of human origin, the undersigned requested a pilot study to determine the

concentration of MRSE that induces osteomyelitis in rabbits.

MRSE concentration used in studies on animals and 5×10^5 CFU / ml, 5×10^6 CFU / ml and 5×10^8 CFU / ml, were established based on their own experience and the recommendation of the study coordinator. There is no literature on the induction of osteomyelitis in rabbits with MRSE.

This study was conducted on the basis of the OECD International Standard for Good Laboratory Practice (GLP) - ENV / MC /CHEM (98) 17.

Animals

- Species / Strain: Rabbits / New Zealand White.
- Source: Laboratory Animal Breeding - Cantacuzino Institute (INCDMM Cantacuzino).
- Gender: Males and females
- Body weight: range over 2500 grams at the start of testing.
- Age: youth - adult, minimum 6 months.
- Acclimatization period: minimum 5 days.
- Total number of animals: 30
- Identification method :
 - for animals - ear marking.
 - for cages - label.

Animal management

- All aspects of animal care and accommodation have been in accordance with ISO 10993-2.
- Experimental space: Conditions according to the Standard Procedures INCDMM Cantacuzino.
- Feeding: The animals were fed standardized pelleted feed, *ad libitum*. The feed does not contain known contaminants that interfere with the test results. Feed data are archived at CI.
- Water: The animals were fed drinking water, *ad libitum*. The water does not contain known contaminants that would interfere with the test results. Periodic water analysis is performed and the results are archived at CI.
- Accommodation: The animals were housed in groups in individual stainless steel cages identified by a label indicating, sex of animals, test lot, animal ID, experimental procedure (list of intervention on the animal).
- Microclimate: The room temperature was monitored daily and maintained in the range of 18 - 24 ° C. The room humidity was monitored daily and maintained in the range of 35-75%. The light cycle is controlled to maintain a rate of 12 hours light / 12 hours darkness.
- Accreditations: The CI test unit is authorized by the Bucharest Sanitary Veterinary Directorate
 - through the Sanitary Veterinary, Authorization no. 426 / 10.29.2018.
 - The project was approved favorably by the ethics commission of CI, EC approval 351 / 13.08.2019 and approved by DSVSA Bucharest, No. 471 / 02.10.2019.
- Personnel: Appropriately qualified and trained personnel were used for this test.
- Selection: Only healthy animals that have not been used in previous tests were selected.

Groups scheme

3 groups of animals were created and for each of the groups 3 sublots were created:

Group	No of animal	Procedures to be performed
1 a	5	inoculated with MRSE, conc 5×10^5 CFU / ml - and followed the installation of the acut form of the disease
1 b	5	inoculated with MRSE, conc 5×10^5 CFU / ml - and followed the installation of the chronic form of the disease
2 a	5	inoculated with MRSE, conc 5×10^6 CFU / ml - and followed the installation of the acut form of the disease
2 b	5	inoculated with MRSE, conc 5×10^6 CFU / ml - and followed the installation of the chronic form of the disease
3 a	5	inoculated with MRSE, conc 5×10^8 CFU / ml - and followed the

		installation of the acute form of the disease
3 b	5	inoculated with MRSE, conc 5×10^8 CFU / ml - and followed the installation of the chronic form of the disease

Subdivision scheme

The subdivision was made according to the internal subdivision procedure of the testing facility (Cantacuzino Institute).

Working method

a. Creating bone defects

On totally anesthetized rabbits, two bone defects of 1 mm in diameter were made in the tibia of the left leg of each animal. The field operation was prepared preoperatively, to achieve the antiseptics with 2% iodine and have been used for such fields to create a sterile field. The incision has been practiced in the skin and its tissue subcutaneous and cortical bone were exposed via blunt dissection. Then the periosteum was incised, removed it off the bone surface. Cortical bone of the tibia was then exposed. By using a drill of 1 mm were created 2 bone defects at a distance of about 10 mm each and approx. 15 mm from the femur-tibio-patellar joint, up to the medullary cavity, resulting in 2 geodes of 1 mm diameter. Immediately postoperatively for three days was made treatment with analgesics in all rabbits.

b. MRSE inoculation

In the created bone defects were introduced two cotton meshes immersed in the bacterial suspension in advance over which we inoculated 0.05 mL of MRSE in each bone defect in the appropriate concentrations of each groups. We took care that the solution was inoculated only in bone defect. Operation was close by practicing suturing; 2-3 points separated using non resorbable thread. A protective layer of Aluminum, sterile compresses and a Pet-Flex bandage were applied over the wound closed.

The surgical technique is highlighted in the figure below



MRSE bacterial inoculation technique

Monitoring animals and the evolution of the disease

The monitoring of the animals lasted a total of 30 days (differentiated by sublots) and was done by:

Clinical examination daily for the general and local health

- Local signs of inflammation, abscesses that spontaneously fester and heal, swelling, erythema were followed.
- Weekly weighing for all animals.
- Hematological examination.

Microbiological examination - at 15 and 30 days

Necropsy: in all animals killed during the experiment and euthanized during the study and at the established dates.

Examinations of the inoculated tibia and of various tissues with macroscopically visible changes were performed.

Histological monitoring - ongoing.

Results

Survival rate: in this experiment a survival rate of 100% was recorded in all groups.

The analysis of the clinical signs made by observation and found during the experiment highlights the following:

Group 1 - no clinical signs

Group 2 - 3 rabbits presented abscesses approximately 7 days after the induction of the disease, abscesses that remained in different forms (suppurative or encapsulated) approximately 30 days after the operation; 2 rabbits had an open wound approximately 6 days after inoculation.

Group 3 - 5 rabbits showed abscesses approximately 7 days after disease induction, abscesses that remained in various forms (suppurative or encapsulated) throughout the study. 2 rabbits showed diarrhea 2 days after inoculation.

Body weight was monitored by weighing the animals on a RADWANG scale.

The evolution of body weight was as shown in the table below

Group	The day of the experiment	Average body weight (grams)
1	0	2831,61
	14	2765,62
	30	2708,35
2	0	3190,90
	14	2892,68
	30	2714,65
3	0	3109,22
	14	2754,23
	30	2724,33

Body temperature - measured using a digital thermometer, by placing in rectum, daily in the first 10 days and then weekly. The results are as follows:

Group	1	2	3	4	6	7	8	9	10	14	30
1	40,24	39,27	39,55	38,82	37,8	38,26	39,55	39,46	39,11	39,66	38,68
2	40,23	40,06	39,76	38,69	37,78	38,6	38,66	39,23	38,66	38,81	37,33
3	41,23	41,44	40,05	40,15	39,8	38,98	39,09	39,90	40,01	38,25	38,76

Haematological tests were performed on an Idexx Procyte 5 Diff device, from blood collected on EDTA. The results are as follows:

Determined parameter	D 0			D 14			D 30			Device reference values
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
RBC 10 ¹² /L	5.18	5.22	5.29	4.56	4.11	4.67	5.80	5.6	5.27	4.62-5.96
HCT %	33.63	33.13	33.12	30.55	25.83	31.13	34.76	37.15	36.13	40-50
HGB g/dL	11.09	11.09	12.08	9.85	8.06	11.09	11.43	11.7	16.09	13.3-16.7
MCV fL	64.97	63.34	63.44	67	62.9	62.34	59.76	66.35	67.34	46.0-72.0
MCH pg	21.4	21.20	21.98	21.6	19.46	19.20	19.66	20.9	23.20	15.0-19.0
MCHC g/dL	32.93	33.5	33.11	32.25	30.96	33.59	32.9	31.55	33.58	32.7-34.9
RDW %	15.42	15.04	16.21	16.1	18.26	13.04	20.66	16.1	15.4	-
RETIC %	3.04	2.69	2.72	5.1	6.366	1.69	2.3	2	2.69	-
RETIC K/ μ L	159.04	139.93	140.51	232.75	244.6	245.76	133.66	106.35	149.93	81.7-231.0
WBC 10 ⁹ /L	6.84	6.66	6.77	7.16	10.366	12.34	14.25	7.185	12.66	3.27-11.14
NEU %	23.17	24.56	22.22	38.65	41.16	44.56	52.26	59.5	24.56	-
LYM %	65.190	62.58	64.42	41.5	32.366	32.58	34.43	30.7	42.58	-
MONO %	5.554	7.0266	6.66	11.9	21.93	18.91	8.76	5.7	7.66	-
EOS %	1.40	1.173	1.1	1.4	1.066	1.13	0.9	1	1.73	-
BASO%	4.672	4.653	4.61	6.55	3.46	4.53	3.633	3.1	4.63	-
HETERO 10 ⁹ /L	1.58	1.636	1.88	2.85	4.32	1.63	9.70	4.16	1.66	1.31-5.01
LYM 10 ⁹ /L	4.47	4.169	4.91	2.905	3.22	4.19	2.83	2.31	4.19	1.96-9.47
MONO 10 ⁹ /L	0.373	0.469	0.65	0.83	2.34	0.69	1.22	0.415	0.44	0.00-1.11
EOS 10 ⁹ /L	0.098	0.079	0.1	0.1	0.11	0.07	0.11	0.075	0.1	0.00-0.22
BASO 10 ⁹ /L	0.31	0.308	0.31	0.475	0.36	0.32	0.376	0.225	0.38	0.00-0.01
PLT K/ μ L	137.63	183.8	165.8	440.5	667.66	564.32	464.33	292.5	283.8	300-700
MPV fL	6.5	6.54	6.12	6.7	6.66	6.54	7.133	7.2	6.54	-
PDW fL	6.13	6.33	7.45	6.5	6.6	6.33	7.166	7	6.63	-
PCT %	0.093	0.120	0.079	0.295	0.44	0.110	0.33	0.205	0.208	-

The microbiological examination was performed on samples of medullary tissue collected from the tibia, on blood samples to identify MRSE by blood culture and on samples collected from various organs with macroscopic lesions. The results of the analysis of blood samples showed that MRSE was present in the blood in the first 14 days after inoculation only in group 3, at the end of the experiment no longer being identified.

Results after the MALDI TOF examination

Group	Subgroup	Examined samples	Microorganism identified	
			15 days after inoculation	30 days after inoculation
1	a	Medullary tissue in the tibia	Unidentified	-
	b		-	Unidentified
2	a	Medullary tissue in the tibia	Unidentified	-
	b		-	unidentified
3	a	Medullary tissue in the tibia	MRSE – 4 rabbits	-
	b		-	MRSE – 1 rabbit

Microbiological examination results

Necropsic examination has carried out to the rabbits euthanized as per protocol.

Group 1: No macroscopic changes

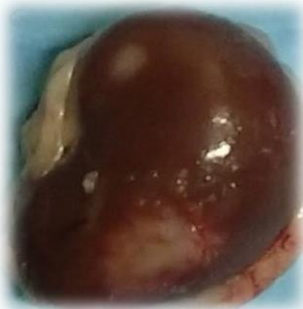
Group 2: Renal abscesses in 4 rabbits and renal congestion in 2 rabbits.

Group 3: The necropsy examination revealed the existence of lesions in the operated tibia and in the organs, so macroscopic changes could be observed, especially in the cardio-respiratory system, kidney, splenic and muscle.

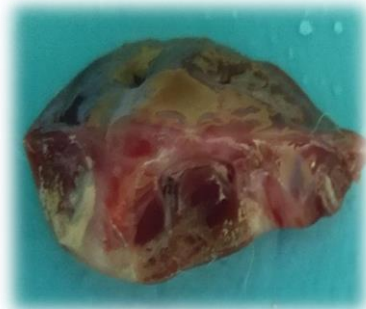
Below are presented images of the observed lesions



Cardiac degeneration



Renal infarction

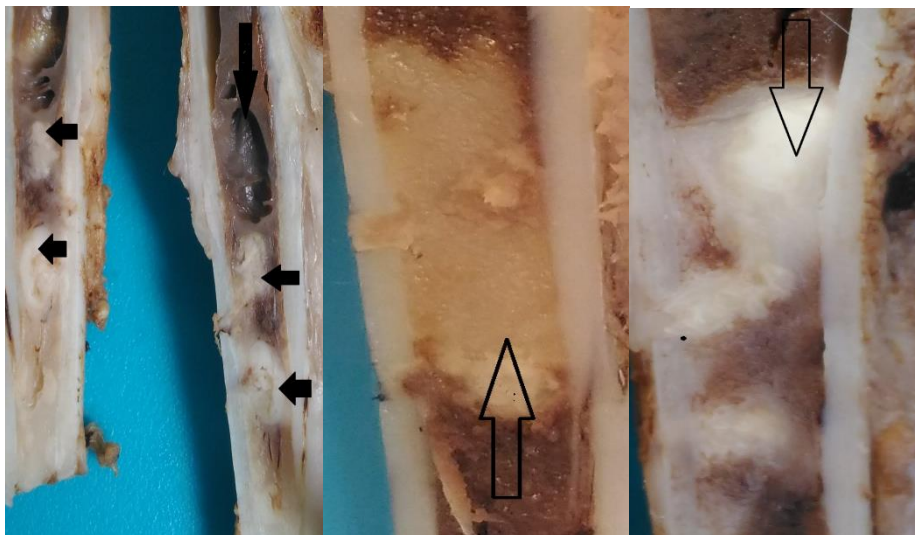


Muscle necrosis

Organs with macroscopic changes

Histopathological examination - in progress

After decalcification, a longitudinal section was observed in rabbits from group 3, in which necropsy lesions were observed, before cutting and staining, and lesions were found in the tibia.



Longitudinal sections through the affected tibias

Tibia with macroscopic changes

The survival rate has been 100% in all groups.

The analysis of *clinical signs* certified the existence of lesions in only 2 groups; more pronounced in group 3, inoculated with the highest concentration of MRSE.

The temperature has been raised in the early days, then averaged entered a normal landing.

Body weight was decreased in the first 7 days after inoculation, and then maintained in the plateau.

The results of the *blood analyzes* are inconsistent and without statistical significance. The values obtained are within the reference values of the apparatus to be analyzed, and the differences between the batches are not relevant.

Microbiological analyzes show the identification of the bacterium only in group 3 and in several rabbits (apr 80%) in the acute phase.

Histological analysis is ongoing.

Conclusion

We can say that clinical signs and microbiological results were observed only at the concentration of 5×10^8 CFU /ml. Depending on the histological and biofilm results, it will be decided whether to use this concentration or increase the concentration.

Osteointegration study of the Zimmer Dental Metal implant

Materials and methods:

- 5 Rabbits, over 6 months old, weighing 2.5-3 kg, males and females 2 le
- 5 trabecular implants TM MB10
- 5 trabecular implants TMMB10 + PSF



Zimmer TMMB10 trabecular implant

- Made of a Titan-Aluminum alloy, and the trabecular area of Tantalum
- Conical shape with triple lead wire
- The surface of the implant section is treated to facilitate osseointegration
- 10 mm long, diameter 3.7 mm

The implant was first performed on an *ex vivo* tibia. Two ways of implantation were tried, being chosen based on the discussions with colleagues from the consortium, the one in which the implant crossed the tibia and came in contact with both cortical areas.

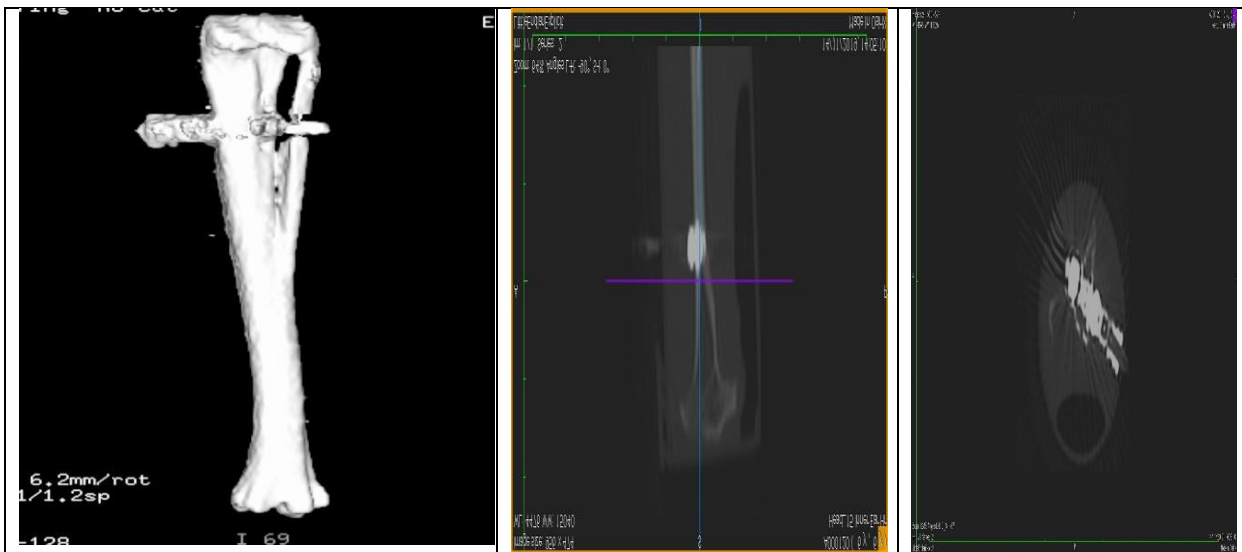


a – Implantation on one side of the tibia



b - Implantation on both side of the tibia

CT examination was also performed on the b sample, the results showing that the implant can be integrated, but the parameters of osseointegration, respectively bone density, trabecular density, etc. cannot be analyzed very well.



Images from Computer Tomograph

Implantation technique

5 young rabbits were selected, New Zealand males and females, 2-3 kg., at the beginning of the study. The animals were individualized and formed a group.

Procedures performed

The operations prior to inoculation were identical to those after the induction of osteomyelitis.

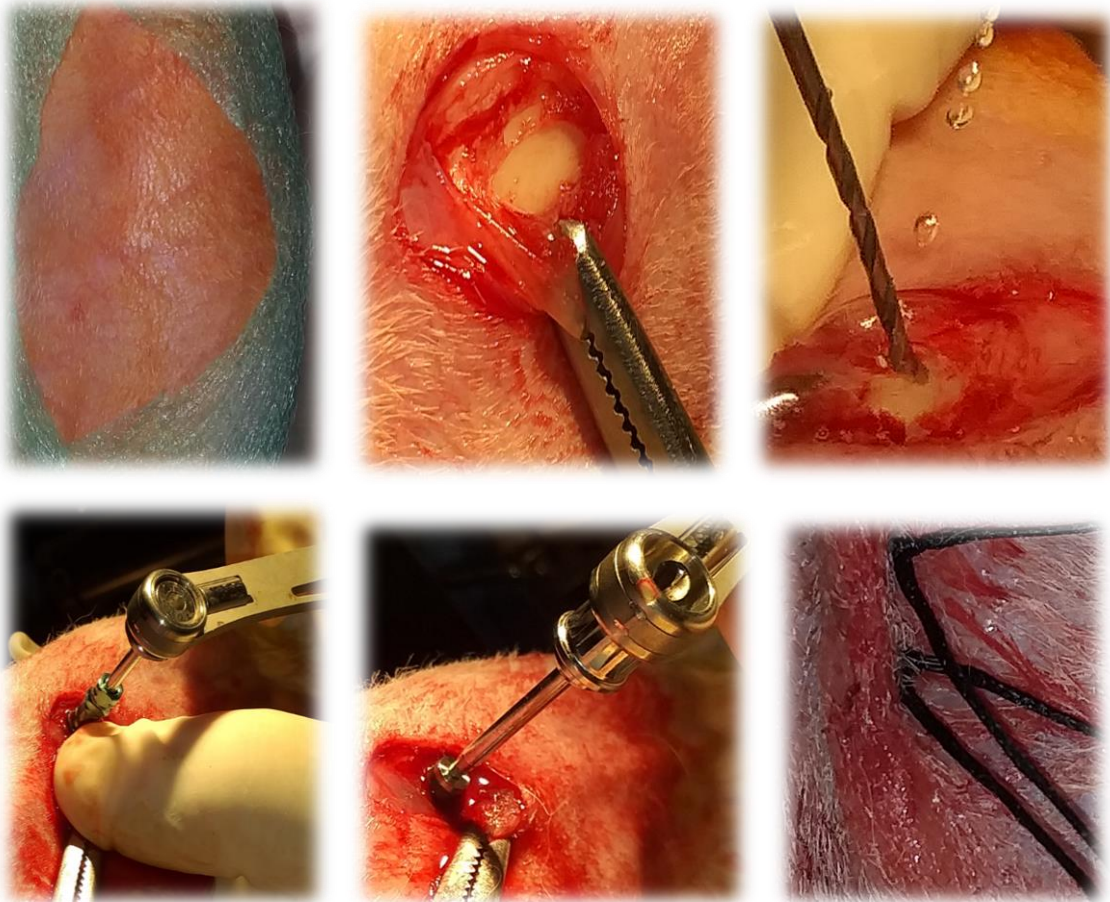
Left hind limb: a cavity was created at the tibia, progressively, using 1mm, 1.5mm, 2mm, 2.5mm, 3mm and 3.5mm drills. The whole process of creating the cavity was carried out under cooling with pure water, in a continuous jet.

The TMMB10 trabecular implant was screwed into the cavity, then the fixing end was detached and the healing screw was mounted. The wound was sutured in 2-3 separate points over which a protective layer of Aluminum was applied, sterile compress and PetFlex type dressing.

Right hind limb: same as the other leg, only the TMMB10 + PSF trabecular implant was placed in the cavity.

Postoperative: antibiotic treatment (Enrofloxacin 5mg / kg, 5 days) and anti-inflammatory (Ketofen 3mg / kg, 5 days).

The operation is summarized in the photos below



Implantation operation

At 14 days, a radiological examination was performed and the radiological result showed the success of the surgery.



Radiological examination 14 days after implantation

Clinical monitoring also shows that the healing process is normal.



Next, in January 2020 the animals will be euthanized and the tibias to make microCT exam, his topologic and assessing of osseointegration. I mention that to perform histology colleagues in the consortium requested that the parts must be processed by including in the resin and cutting a especially device without removing the implant, but since Romania no such equipment they have agreed to perform clasical techniques: demineralization, embedded in paraffin, removing the implant site, hematoxiline-eosine staining.

Preliminary results indicate an osseointegration of the implant but this must be confirmed by subsequent evaluations.

Conclusions

1. Animal studies have been performed after authorization by the competent authority.
2. The MRSE strain to be used in the studies was evaluated and characterized.
3. The study of induction of osteomyelitis with MRSE strain showed that osteomyelitis reproduces at a concentration of 5×10^8 CFU / ml. It remains for histological and biofilm analyzes to confirm the concentration.
4. For the osteointegration study, surgical technique was developed and implantation was performed. Osteointegration will be evaluated after performing the microCT and histological examination.

Bibliography

1. Bottagisio, M., Soggiu, A., Lovati, A. B., Toscano, M., Piras, C., Romanò, C. L., Bonizzi L., Roncada P., Drago, L. (2017). Draft genome sequence of *Staphylococcus epidermidis* clinical strain GOI1153754-03-14 isolated from an infected knee prosthesis. *Genome Announcements*, 5(20). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00378-17>.
2. OECD - ISO 10993-2, Biological evaluation of medical devices Part 2: Animal welfare requirements, 2016.
3. Law nr. 43 from 11 april 2014 regarding protection of laboratory animal, actualized, 2019.
4. Masters EA, Trombetta RP, de Mesy Bentley KL1, Boyce BF, Gill AL, Gill SR, Nishitani K1, Ishikawa M, Morita Y, Ito H, Bello-Irizarry SN, Ninomiya M, Brodell JD Jr, Lee CC, Hao SP, Oh I, Xie C, Awad HA, Daiss JL1, Owen JR, Kates SL, Schwarz EM, Muthukrishnan G. Evolving concepts in bone infection: redefining “biofilm“acute vs. chronic osteomyelitis”“the immune proteome” and local antibiotic therapy. *Bone Res.* 2019; (15)7:20.
5. Coman C, Surdu-Bob C, Turcu D, Vlase E, Oporanu M, Badulescu M. Clinical and microbiological evaluation of a model of human osteomyelitis. *Rev. Rom. Med. Vet.* 2013; 2: 65-72.
6. Bottagisio M, Coman C, Lovati AB. Animal models of orthopaedic infections. A review of rabbit models used to induce long bone bacterial infections. *J Med Microbiol.* 2019;68(4):506-537.
7. Zohra Khatoon, Christopher D. McTiernan, Erik J. Suuronen, Thien-Fah Mah, Emilio I. Alarcon. Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon* 4 (2018) e01067. doi: 10.1016/j.heliyon.2018.e01067.

8. Ramasamy M, Lee J. Recent Nanotechnology Approaches for Prevention and Treatment of Biofilm- Associated Infections on Medical Devices Recent Nanotechnology Approaches for Prevention and Treatment of Biofilm-Associated Infections on Medical Devices. *Biomed Res. Int.* (2016:1851242.) (2016).
9. Shah SR, Tataru AM, D'Souza RN, Mikos AG, Kasper FK. Evolving strategies for preventing biofilm on implantable materials. *Mater. Today.* 16(5), 177–182 (2013).
10. Lovati AB, Lopa S, Ò GT, et al. In vivo evaluation of bone deposition in macroporous titanium implants loaded with mesenchymal stem cells and strontium-enriched hydrogel. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 103(2) (2015).
11. Lovati AB, Bottagisio M, Vecchi E De, Gallazzi E, Drago L. Animal models of implant-related low-grade infections. A twenty-year review. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology.* (2017).
12. Lovati AB, Romanò CL, Bottagisio M, et al. Modeling staphylococcus epidermidis-induced non-unions: Subclinical and clinical evidence in rats. *PLoS One.* 11(1) (2016).
13. Lovati AB, Drago L, Bottagisio M, et al. Systemic and Local Administration of Antimicrobial and Cell Therapies to Prevent Methicillin-Resistant Staphylococcus epidermidis -Induced Femoral Nonunions in a Rat Model. *Mediators Inflamm.* 2016 (2016).
14. Surdu-Bob CC, Coman C, Barbuceanu F, Turcu D, Berbaru N, Badulescu M. The influence of foreign body surface area on the outcome of chronic osteomyelitis. *Med. Eng. Phys.* 38(9), 870–876 (2016).
15. Artzi Z, Nemcovsky CE, Tal H, Kozlovsky A. Timing of Implant Placement and Augmentation with Bone Replacement Material: Clinical Assessment at 8 and 16Months. *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* 15(1), 121–129 (2013).
16. Lovati AB, Romanò CL, Bottagisio M, et al. Modeling staphylococcus epidermidis-induced non-unions: Subclinical and clinical evidence in rats. *PLoS One.* 11(1) (2016).
17. Shon W-J, Chung SH, Kim H-K, Han G-J, Cho B-H, Park Y-S. Peri-implant bone formation of non-thermal atmospheric pressure plasma-treated zirconia implants with different surface roughness in rabbit tibiae. *Clin. Oral Impl. Res.* 25, 2014, 573–579. doi: 10.1111/clr.12115.
18. David Reinedahl, Silvia Galli, Tomas Albrektsson, Pentti Tengvall, Carina B. Johansson, Petra Hammarström Johansson, Ann Wennerberg. Aseptic Ligatures Induce Marginal Peri-Implant Bone Loss—An 8-Week Trial in Rabbits. *J. Clin. Med.* 2019, 8, 1248; doi:10.3390/jcm8081248.
19. Jun-Beom Lee, Ye-Hyeon Jo, Jung-Yoo Choi, Yang-Jo Seol, Yong-Moo Lee, Young Ku, In-Chul Rhyu, In-Sung Luke Yeo. The Effect of Ultraviolet Photofunctionalization on a Titanium Dental Implant with Machined Surface: An In Vitro and In Vivo Study. *Materials* 2019, 12, 2078; doi:10.3390/ma12132078.
20. Sergio Alexandre Gehrke, Tiago Luis Eliers Treichel, Letícia Pérez-Díaz, Jose Luis Calvo-Guirado, Jaime Aramburú Júnior, Patricia Mazón, Piedad N. de Aza. Impact of Different Titanium Implant Thread Designs on Bone Healing: A Biomechanical and Histometric Study with an Animal Model. *J. Clin. Med.* 2019, 8, 777; doi:10.3390/jcm8060777.

RAPORTARE STIINTIFICA 2020

Obiective an 2020

Obiective consorțiu :

- Sinteza peptidelor;
- Producerea de implanturi metalice încărcate cu PSF ;
- Determinarea celor mai bune antibiotice care se pot integra cu peptidele și ulterior libera lent;
- Selectarea celor mai bune variante de tratament;
- Testarea variantelor alese *in vitro*;
- Demararea studiilor pe animale de testare a eficienței tratamentului preventiv.

Obiective Institutul Național de Cercetare Dezvoltare Medico-Militară „Cantacuzino,, :

- Evaluarea studiului de osteointegrare a implantului dentar Zimmer în tibia de iepure.
- Caracterizarea genetică a tulpinii de methicillin-resistent *Staphylococcus epidermidis* (MRSE);
- Validarea inducerea la iepure osteomielitei cu tulpina MRSE, în zona medulară și trabeculară a tibiei;

Rezumatul etapei 2020

Anul 2020 caracterizat prin pandemia de COVID 19 a determinat amânarea cu 1 an a derulării proiectului (toate activitățile fiind decalate corespunzător). Institutul Ortopedico Galeazzo din Milano, care este institutul coordonator s-a transformat în centru COVID, activitatea de cercetare fiind anulată până în august 2020. Institutul Demokritos din Atena a fost în carantină 2 luni, ei reușind identificarea unor variante de tratament preventiv cu antibiotice cu descărcare lentă. Urmează validarea tratamentului prin teste *in vitro*, încărcarea implanturilor și evaluarea eficienței tratamentului propus.

În aceste condiții Institutul Cantacuzino a caracterizat genetic tulpina de methicillin-resistent *Staphylococcus epidermidis* – MRSE, tulpină transmisă în 2019 de către coordonatorul proiectului (IOG). Tulpina are un profil genetic stabil pentru genele de rezistență la antibiotice, factorii de virulență și proteinele de suprafață.

Început în anul 2019 studiul de osteointegrare s-a finalizat în 2020 prin evaluarea imagistică și histopatologică. Rezultatele au arătat că implantul dentar folosit (Zimmer implant) se osteointegrează în tibia de iepure, indiferent dacă este un implant simplu sau încărcat cu fibrină.

După transmiterea rezultatelor s-a efectuat o introducere a implantului în zona trabeculară a tibiei în zona proximală pentru a mima exact boala umană care se instalează după montarea de dispozitive protetice în zona articulară. Implantul s-a fixat și a arătat osteointegrare și în acea zonă.

Tot în același scop de a crea un model translațional perfect de la iepure la om s-a efectuat un studiu de inducere a osteomielitei la iepure prin inocularea bacteriei în doza optimă stabilită în experimentul din 2019, respectiv 5×10^8 UFC/ml, prin inoculare medulară și trabeculară. S-au creat, în aria de experimentare pe animale a CI, 3 loturi de iepuri lot de control, lot inoculat în zona trabeculară și lot inoculat în zona medulară. Fiecare lot a fost împărțit în 2 subloturi, unul pentru faza acută și unul pentru faza cronică a bolii. Animalele au fost monitorizate clinic, hematologic, iar la sfârșitul perioadei de evaluare au fost eutanasiate, s-au recoltat probe pentru examenul microbiologic și histologic. Osteomielita s-a instalat la peste 75% dintre iepurii inoculați, în faza acută, iar viabilitatea este de peste 90%.

Descrierea științifică și tehnică

Caracterizarea genetică a tulpina bacteriene de MRSE

Tulpina de MRSE a fost transmisă de către instituția coordonatoare a proiectului, IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi din Milano, Italia (IOG), pe 3 plăci, la începutul lunii octombrie 2019. Laboratorul de microbiologie din CI, a revitalizat-o de pe plăcile pe care a sosit și a analizat-o caracteristicile ei fiind prezentate în raportul din 2019. Pentru a deosebi tulpina de MRSE utilizată în inducerea osteomielitei a fost necesară caracterizarea genetică a ei.

Caracteristici genetice – Secvențele de genom ale tulpinii MRSE, GOI1153754-03-14, sunt depozitate în Banca Internațională de Gene - DDBJ/ENA/GenBank, iar secvența complete se pot găsi aici - <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28522724>.

În primul rând, s-au secvențiat regiunile amplificate pentru tastarea mai multor loci (MLST), aceasta fiind o procedură fără echivoc pentru caracterizarea izolatelor speciilor bacteriene izolate (<https://pubmlst.org/sepidermidis/info/primers.shtml>).

Apoi s-a urmărit identificarea de gene prezente în genomul tulpinilor bacteriene izolate clinic și care nu sunt atât de frecvente în *S. epidermidis* ce contaminează în general mediul. Întrucât nu erau primeri testați în laboratorul nostru în acest scop, am decis să căutăm în literatură pentru a afla câteva gene importante pentru identificarea tulpinilor de *S. epidermidis*. Aceste gene sunt legate de factorii de virulență și rezistența la antibiotice. Prin amplificarea acestor regiuni, se poate selecta *S. epidermidis* recoltat de la animale, dar nu este suficient să concluzionăm cu siguranță că tulpinile sunt cele inoculate. Singura modalitate de a potrivi cu siguranță bacteriile extrase de la animale cu cele inoculate este de a secvenția genomului bacterian și de a-l superpoza cu genomul inoculat al bacteriei izolate clinic, însă acest proces este mare consumator de resurse și nu justifică integralscopul proiectului.

Ca și gene de interes, s-au amplificat genele *icaA* și *icaD*. Locusul *ica* este implicat în procesul de formare a biofilmului și există unele (din păcate nu atât de multe) tulpine

MRSE fără gene *ica*. În mod similar, pentru a diferenția MRSE se poate amplifica gena *mecA* (nu atât de frecvent ca *ica*). Verificând un articol de pe Pubmed (PMID: 23705749), în care autorii au amplificat *S. epidermidis* genele *icaA*, *icaD* și *mecA* s-au verificat primerii care simulează un PCR in silico cu acest instrument online <http://insilico.ehu.es/PCR/index.php?mo=Staphylococcus> pentru a confirma capacitatea celor trei perechi de primeri pentru a amplifica secvențele genomului țintă și toate funcționează in silico. Pe scurt, s-a inserat secvența primerului F și primerului R și I, s-a selectat *S. epidermidis* RP62A (ATCC 35984) ca referință.

Mai mult, s-au asociat secvențele de primer cu genomul bacterie clinic *S. epidermidis* izolată clinic pentru a avea o confirmare suplimentară. Această strategie ar trebui să funcționeze, singura diferență pe care am observat-o este că lungimea secvenței *mecA* este nu 224 bp așa cum sa raportat în lucrare, ci mai lungă (533 bp).

O altă strategie paralelă care poate fi luată în considerare pentru a consolida rezultatele PCR, este evaluarea rezistenței la un panel de antibiotice. Se mai compara valorile MIC inițiale cu cele ale tulpinei extrase din animale pentru a avea o confirmare suplimentară a rezultatelor.

În cadrul laboratorului de microbiologie au fost pregătite soluțiile de MRSE utilizate în studiile pe animale, în concentrație de 5×10^8 UFC/ml și au fost analizate microbiologic probele recoltate de la animale.

Evaluarea osteointegrării implantului Zimmer Dental Metal în zona medulară a tibiei de iepure

Experimentul a început în 2019, iar finalizarea evaluării a fost în 2020.

Pe scurt experimentul a fost efectuat astfel :

Studiul a fost evaluat și avizat de către comisia de etică și aprobat de către autoritatea competentă.

S-au selectat 5 iepuri, Noua Zeelandă masculi, 3000 -3500 g., în momentul începerii studiului. Animalele au fost individualizate și marcate.

Înainte de a începe intervenția chirurgicală, animalele au fost puse la dietă 16-18 ore.

Intervenția chirurgicală: animalele au fost anesteziate profund, s-a tuns blana de la nivelul membrului posterior stâng și drept, în zona tibiei și s-a dezinfectează cu Iod. S-a administrat și un anestezic local. S-a incizat pielea și țesutul subcutanat, urmată de disecția boantă a periostului și expunerea cortexului. S-a creat o cavitate la nivelul tibiei, în mod progresiv, folosind burghiu de 1mm, 1,5mm, 2mm, 2,5 mm, 3mm, 3,5mm și 4mm. Întreg procesul de creare a cavității s-a realizat sub răcire cu apă pură, în jet continuu. Cu un kit dentar de implantare s-a implantat implantul dentar trabecular Zimmer ca atare gol și cu fibrin (TMMB10/TMMB10+PSF) în cavitatea din piciorul stâng/drept, apoi s-a detașat capătul de fixare și s-a montat șurubul de cicatrizare. Implantarea s-a realizat în ambele

parti ale tibiei. S-a practicat sutura plăgii operate cu fir neresorbabil în 2-3 puncte în "U", peste care s-a aplică un strat protector de Aluminiu. Membrele operate s-au protejat prin aplicare de comprese sterile și pansament tip Pet-Flex. Toate animalele au primit post operator tratament analgezic 3 zile și antibiotic 5 zile.

S-a evaluat starea clinica generala zilnic. Timp de 5 zile animalele au fost termometrate zilnic. Greutatea s-a masurat saptamanal.

La aproximativ 30 zile de la montarea implanturilor, animalele au fost eutanasiate eutanasiate, s-au recoltat tibiile și s-au trimis către evaluarea imagistică cu microCT, ulterior către laboratorul de histopatologie.

Analiza imagistică

Evaluarea imagistică s-a facut cu un Micro-CT (SkyScan 1172, Kontisch, Belgium).

Eșantioanele au fost plasate vertical într-un suport și scanate. Scanarea a fost efectuată la 56 kV și 100 μ A. Rezoluția slidurilor a fost de 26,85 μ m. Au fost făcute 664 sliduri. Timpul de expunere a fost de 700 ms cu un timp total de scanare de 52,28 min (128 mAs). Nu au fost folosite filtre.

Cu ajutorul programului software NRecon v1.6.1.5 (Skyscan, Belgia) au fost reconstruite imaginile. Toate datele au fost exportate în format Dicom și importate în Amira (Visage Imaging GmbH, Berlin, Germania) pentru evaluare. Deoarece o parte a implantului se afla în afara osului, datele au fost decupate de-a lungul axei implantului până unde a început osul cortical. Înainte de segmentare, au fost determinate nivelurile de prag pentru os și implant, pe baza inspecției vizuale a feliilor complete și a histogramei la scară. Acest lucru a fost realizat prin determinarea nivelurilor pragului superior și inferior pentru os și implant în 5 probe pentru fiecare tip de implant. Pragurile de os și implant nu s-au suprapus și au permis să se facă o distincție clară. Mijloacele au fost calculate și utilizate pentru fiecare probă. Determinarea pragului a fost repetată pentru evaluarea repetabilității intra și inter-examinare.

Apoi, a fost definită o regiune de interes (ROI), unde a fost calculată aria osoasă (BA). Prin urmare, implantul a fost selectat pe baza nivelului său de prag și această regiune a fost extinsă circumferențial, creând o zonă de 0,75 mm în jurul implantului.

Ulterior, implantul și osul în ROI au fost diferențiate în funcție de nivelurile lor de prag, creând 3 volume: implant, os și țesut moale/spații goale. Acestea au fost convertite în rețea tetraedrică din suprafețe triunghiulare, pentru a face posibile măsurători de suprafață și volum. Variabilele de rezultat au fost zona osoasă (BA), fiind procentul de os care este prezent în regiunea din jurul implantului și BIC (Bone Implant Contact), fiind suprafața-procent a suprafeței totale a implantului care este acoperită de os.

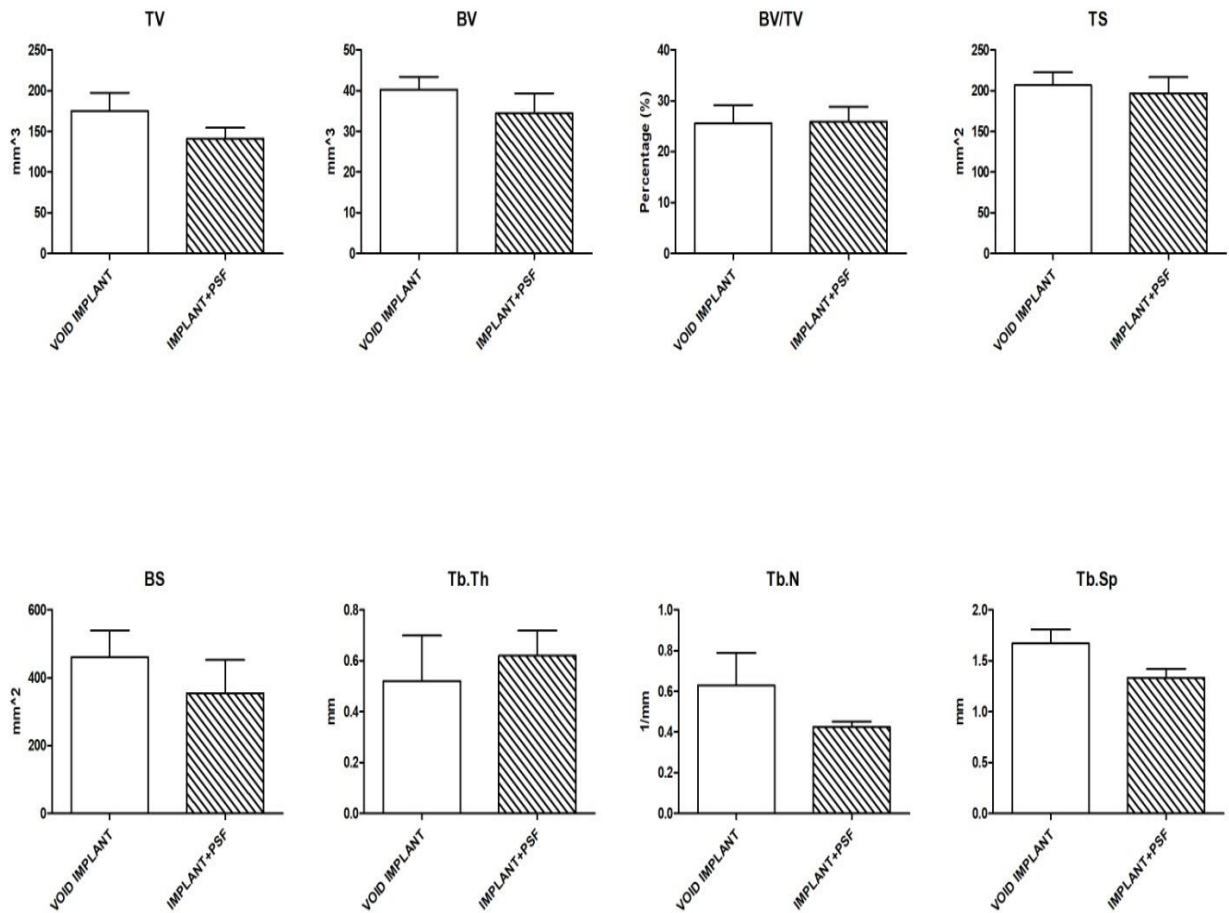
Parametrii analizați au fost:

- BV / TV, fracțiunea volumului osos trabecular;
- DMO, densitatea minerală osoasă;

- TMD, densitatea minerală tisulară;
- Tb.N, numărul trabecular;
- Tb.Th, grosime trabeculară;
- Tb.Sp, separare trabeculară;

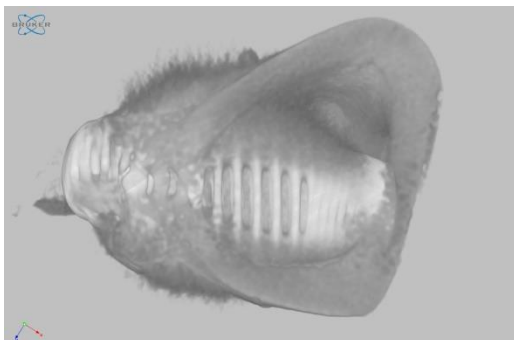
precum și toate variațiile de pe axe.

Sinteza grafică a rezultatelor este prezentată mai jos. Ea s-a făcut prin testul Mann-Whitney,

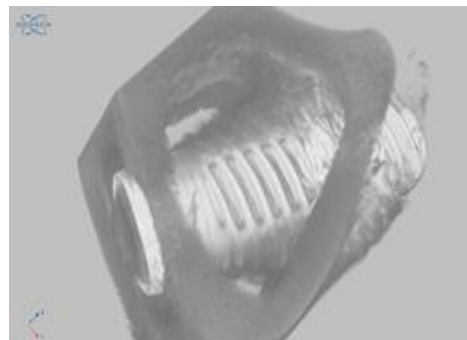


Prezint mai jos câteva imagini selecționate

Imagini 3D



Implant gol

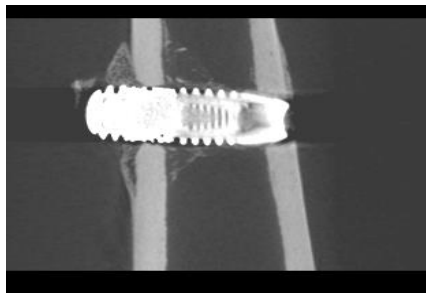


Implant cu fibrină

Imagini axiale

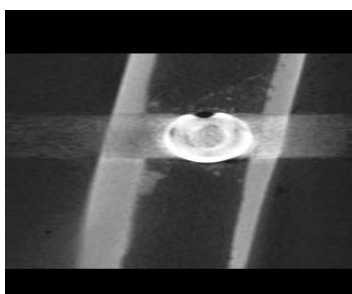


Implant gol

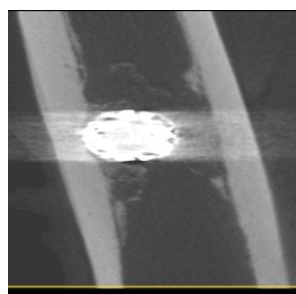


Implant cu fibrină

Imagini sagitale



Implant gol



Implant cu fibrină

La 5 săptămâni după implantare, nu s-au găsit diferențe semnificative în ceea ce privește formarea de țesut osos nou și analiza imagistică a tibiilor de iepure implantate cu implanturi de titan trabecular gol și implanturi încărcate cu PSF. Aceasta înseamnă că prezența fibrinei nu modifică formarea și penetrarea osoasă în spațiile trabeculare ale implanturilor dentare Zimmer.

Analiza histopatologică

Examenul histologic, efectuat pentru toate tibiile care au fost implantate, a urmat protocolul specific: fixarea în soluție de formalină 10%, decalcifiere, extragerea implantului, deshidratarea în soluție de etanol și încorporarea parafinelor. Blocurile de parafină au fost tăiate cu microtomul la o grosime de 5 μm și colorate cu hematoxină și eozină.

Evaluarea a urmărit osteogeneza, celularitatea, efectele implantului asupra structurii osoase, precum și orice alte efecte constatate.

Analiza și evaluarea histologică au arătat existența osteogenezei, prezența celulelor osoase (osteoblaste, osteoclaste) și formarea calusului osos primar la nivelul implantului.

Nu există efecte secundare și nu au fost detectate semne de infecție.

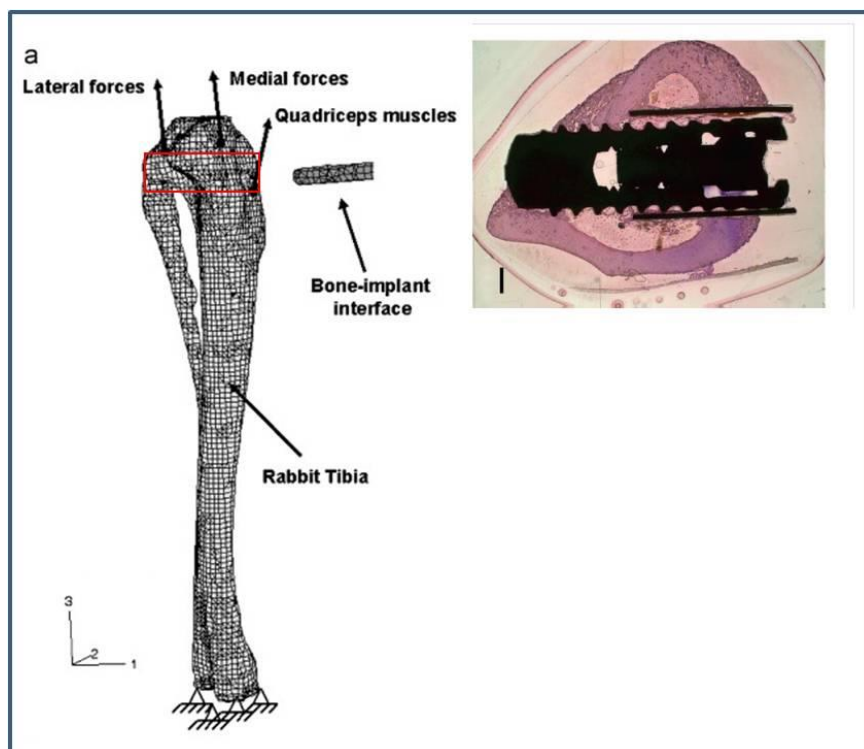
Nu există și lipsă de diferențe între cele două tipuri de implanturi. Implanturile sunt foarte bine tolerate. În niciun caz nu au existat reacții osoase de respingere a implanturilor activitatea osteogenetică fiind prezentă în toate situațiile cu mici diferențe. Menționăm că materialul amorf prezent în unele secțiuni nu declanșează o reacție inflamatorie/corp străin.

Prezența fragmentelor de țesut osos necrotic, sechestrare în reacția periostală și ocazional fibroasă la nivelul cortexului osos, este prezența ocazională fiind corelată cu formarea de sechestre osoase compacte în timpul procedurilor chirurgicale de introducere a implantului.

În concluzie putem afirma că implanturile asigură osteointegrarea și că nu există diferențe între cele 2 tipuri de implant.

Introducerea implantului Zimmer Dental Metal în zona proximal trabeculară a tibiei de iepure

Pentru a valida tranlațional producerea osteomielitei la oameni, osteomielită indusă prin proteze, s-a introdus implantul Zimmer și în zona trabeculară a tibiei.



Tehnica de implantare :

Pe iepurii anesteziati total s-a realizat în tibia piciorului stâng a fiecărui animal, în zona trabeculară proximală, folosind un burghiu de 2.5 mm un defect osos la distanță de aproximativ 3 - 5 mm de articulația femuro-tibio-rotuliană, Imediat postoperator timp de 3 zile s-a făcut un tratament cu analgezice la toți iepurii.

După o monitorizare de 6 săptămâni animalele au fost eutanasiate.

Evaluarea fizică a implantării

Evaluarea clinică a evidențiat faptul că și în zona trabeculară s-a realizat implantarea și se poate utiliza ca model de reproducerea a bolii la om.

Validarea reproducerii osteomielitei la iepuri utilizând o tulpină bacteriană de

MRSE prin inoculare medulară și trabeculară

Studiul din 2019 a fost urmat în 2020 de un studiu de validare a concentrației optime de MRSE capabilă să inducă osteomielita, respectiv 5×10^8 UFC/ml prin inocularea bacteriei intramedular și trabecular.

Acest studiu a fost efectuat având la bază Standardul Internațional OECD de Bună Practică de Laborator (GLP) - ENV/MC/CHEM(98)17.

Animale

- Specie/Tulpina: Iepuri/New Zealand White.
- Sursa: Crescătoria de animale de laborator – Institutul „Cantacuzino” (INCDMM Cantacuzino).
- Sex: Masculi și femele
- Interval greutate corporală peste 2500 grame în momentul începerii testării.
- Vârsta: tineret - adult, minim 6 luni.
- Perioada de aclimatizare: minim 5 zile.
- Număr de animale total: 84
- Metoda de identificare:
 - pentru animale – marcaj pe ureche.
 - pentru custi – eticheta.

Managementul animalelor a fost similar cu cel din studiul din 2019

Metoda de lucru a fost

- a. crearea defectelor osoase
- b. inocularea MRSE
- c. managementul durerii

Toate metodele au fost similare celor din 2019 și 2020 (studiul de osteointegrare trabecular)

Monitorizarea animalelor și a evoluției bolii

Monitorizarea animalelor a durat în total 30 de zile (14 zile – acut, 30 de zile cronic)

Rezultate

Procentul de supraviețuire : în acest experiment s-a înregistrat un procent de supraviețuire de 100% la toate loturile.

Analiza semnelor clinice făcute prin observație și constatate în timpul experimentului evidențiază următoarele:

Lot CM și CT – fără semne clinice

Loturile M - 2 iepuri au prezentat abcese la aproximativ 7 zile de la inducerea bolii, abcese ce s-au menținut în diferite forme (supurative sau incapsulate) aproximativ 30 de zile de la operație ; 2 iepuri au prezentat plaga deschisă la aproximativ 3 zile de la momentul inoculării.

Loturile T – 4 iepuri au prezentat abcese la aproximativ 7 zile de la inducerea bolii, abcese ce s-au menținut în diferite forme (supurative sau incapsulate) tot studiul.

Greutatea corporală s-a monitorizat prin cântărirea animalelor pe un cântar RADWANG.

Evoluția greutății corporale a fost de creștere a greutateii, într-un ritm mai mare la lotul de control.

Temperatura corporala s-a masurat folosind un termometru digital, zilnic in primele 7 zile si apoi saptamanal. Rezultatele nu evidentiaza modificari statistic semnificative.

Analizele hematologice s-au facut pe un aparat Idexx Procyte 5 Diff, din sange recoltat pe EDTA. Rezultatele evidentiaza cresterea neutrofilelor si a liniei albe in general la animalele inoculate cu MRSE, existand astfel un semn de infectie.

Examenenele biochimice efectuate pe un analizor VetTest pe reactivi de stare general de sanatate au evidentiat o crestere a parametrilor renali si hepatici la animalele inoculate cu MRSE, dar fara a fi semnificative.

Examenul microbiologic a fost efectuat pe probe de tesut osos recoltat de la nivelul inocularii tibiei (medular sau trabecular) si pe probe de sange in vederea identificarii MRSE prin hemocultura si pe probe recoltate de la nivelul diferitelor organe ce prezentau leziuni macroscopice. Izolarea tulpinilor bacteriene a fost realizata din probele de tesut neincubate, probele de tesut incubate 24h la $36\pm 10^{\circ}$ C cu 5 mL mediu BHI si din hemoculturile incubate timp de 7 zile la $36\pm 10^{\circ}$ C. Pentru confirmarea cu acuratete a diagnosticului microbiologic, pe langa identificarea prin MALDI – TOF, s-au comparat profilurile de sensibilitate obtinute prin antibiograma difuzimetrica la un set extins de antibiotice ale tulpinilor SCN izolate din probele ID17 – ID43, cu cel al tulpinii MRSE inoculate.

Rezultatele examenului microbiologic

In probele analizate nu a fost identificata nicio tulpina de SCN cu profilul de rezistenta similar tulpinii MRSE folosita pentru inocularea iepurilor.

Diversitatea speciilor izolate din probele analizate inclusiv din probele recoltate de la iepurii din lotul martor, precum si heterogenitatea profilelor de rezistenta la antibiotice (*S. pasteurii* cu 3 AST diferite, *S. epidermidis* cu 2 AST diferite, etc.), sugereaza posibila contaminare a probelor sau a leziunilor provocate pentru inocularea cu tulpina de *Staphylococcus epidermidis* MRSE.

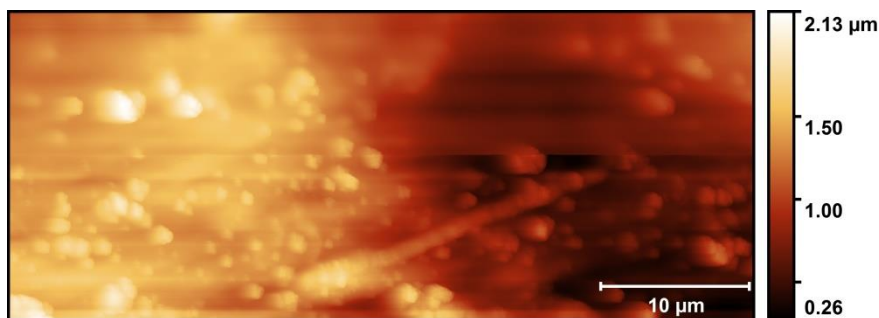
Faptul ca s-au putut identifica mai multe specii bacteriene dupa ultrasonarea probelor a dovedit superioritatea tehnicii fata de simpla vortexare.

Evaluarea imunologica s-a efectuat prin analiza citokinelor pro si antiinflamatoare. Rezultatele evidentiaza existenta unor citokine, la un nivel mediu cu o diferenta care nu este valida statistic. Unele citokine nu au fost insa detectabile. Se impune ca in cazul acestor analize sa se faca o alta abordare de recoltare a probelor, nu doar la finalul studiului, asa cum s-a facut acum.

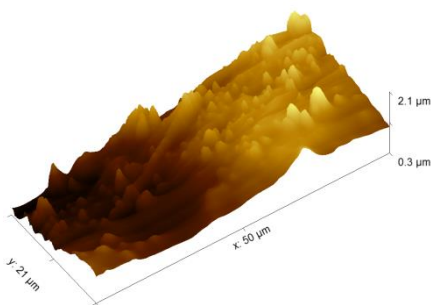
Evaluarea prin microscopul de forta atomica

Prin aceasta evaluare am urmarit sa vedem daca s-a format biofilm pe suprafata exterioara si/sau interioara a osului.

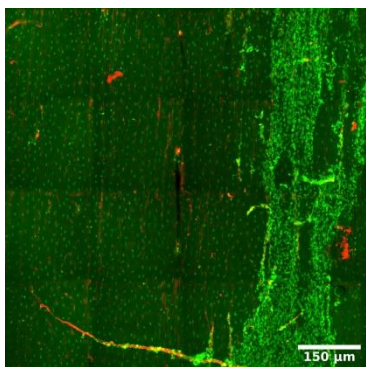
Imaginile captate sunt mai jos:



AFM_Topography_orto



AFM_topography_side



Fluorescență

Fluorescence - imagine de fluorescență cu colorare DAPI pentru nucleu (verde) și eozină pentru proteine (roșu), acoperind o suprafață de 0.8*0.8mm a osului dintr-o regiune ce conține atât periost (dreapta) cât și os expus (stânga). Imaginea este reconstruită în plan din 16 cadre pe XY și 20 pe Z (acoperind 200μm).

AFM_Topography_orto - imagine de topografie AFM pe o arie de 20x50 micrometri; culoarea reprezintă înălțimea pe Z.

AFM_topography_side - aceeași imagine, văzută din lateral;

Pe baza imaginii de fluorescență se pot identifica regiuni ale probei ce conțin biofilme bacteriene (colorare DAPI și eozină) și apoi se merge țintit pe acele zone cu AFM pentru a caracteriza biofilmul (grosime, densitate bacteriană, fibre de aderență, etc.).

Nu s-au găsit asemenea zone, probabil că pe implanturi, dacă se formează biofilm se vor identifica..

Examinarea necropsică s-a efectuat la iepurii eutanasiați conform protocolului de studiu.

Loturi C: Fără modificări macroscopice

Loturile M : Examenul necropsic a evidențiat existența leziunilor la nivelul tibiei operate la 65% din iepurii operați

Loturile T: Examenul necropsic a evidențiat existența leziunilor la nivelul tibiei operate la 76% dintre iepurii operați

Examen histopatologică

Dupa decalcifierea tibiilor s-au facut colorații cu H&E.

Leziunile observate au evidențiat la loturile inoculate cu MRSE în special reacții inflamatorii granulomatoase de corp strain cu prezenta de bacterii cocoide grupate în colonii și compacta distorsionată, fragmente lamelare de os cu fenomene regenerative (proliferare de osteoblaste) ce delimitează fragmentele de os, suplimentar țesut conjunctiv fibros ce consolidează zona de defect. În canalul medular se observă fragmente de os, țesut conjunctiv fibros, reacție de corp strain și insule de țesut hematopoetic. Toate acestea confirmă instalarea osteomielitei.

Concluzionând putem spune că s-au observat semne clinice, rezultate microbiologice și histologice, restul analizelor urmând a fi rafinate odată cu experimentul principal de evaluare a capacității preventive a tratamentului inclus în implant

Concluzii

- Tulpina de MRSE ce se va utiliza în studii a fost caracterizată genetic.
- Implantul ce se va folosi în studiul principal dezvoltă osteointegrare atât în zona medulară cât și cea trabeculară a tibiei de iepure la ambele tipuri de implant (gol și cu fibrină).
- Inducerea osteomielitei cu doză stabilită de MRSE, de 5×10^8 UFC/ml, la nivel medular și trabecular se poate realiza însă este necesară o mai atentă planificare a recoltării probelor atunci când se va efectua studiul principal de evaluare a tratamentului ccontra osteomielitei.

Bibliografie

- Bottagisio, M., Soggiu, A., Lovati, A. B., Toscano, M., Piras, C., Romanò, C. L., Bonizzi L., Roncada P., Drago, L. (2017). Draft genome sequence of Staphylococcus epidermidis clinical strain GOI1153754-03-14 isolated from an infected knee prosthesis. *Genome Announcements*, 5(20). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00378-17>.
- OECD - ISO 10993-2, Biological evaluation of medical devices Part 2: Animal welfare requirements, 2016.
- LEGEA nr. 43 din 11 aprilie 2014 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice, actualizată, 2019.
- Coman C, Surdu-Bob C, Turcu D, Vlase E, Oporanu M, Badulescu M. Evaluarea clinică și microbiologică a unui model de osteomielită umană. *Rev. Rom. Med. Vet.* 2013; 2: 65-72.
- Bottagisio M, Coman C, Lovati AB. Animal models of orthopaedic infections. A review of rabbit models used to induce long bone bacterial infections. *J Med Microbiol.* 2019;68(4):506-537.

- Ramasamy M, Lee J. Recent Nanotechnology Approaches for Prevention and Treatment of Biofilm- Associated Infections on Medical Devices Recent Nanotechnology Approaches for Prevention and Treatment of Biofilm-Associated Infections on Medical Devices. *Biomed Res. Int.* (2016:1851242.) (2016).
- Shah SR, Tataru AM, D'Souza RN, Mikos AG, Kasper FK. Evolving strategies for preventing biofilm on implantable materials. *Mater. Today.* 16(5), 177–182 (2013).
- Lovati AB, Bottagisio M, Vecchi E De, Gallazzi E, Drago L. Animal models of implant-related low-grade infections. A twenty-year review. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology.* (2017).
- Lovati AB, Romanò CL, Bottagisio M, et al. Modeling staphylococcus epidermidis-induced non-unions: Subclinical and clinical evidence in rats. *PLoS One.* 11(1) (2016).
- Lovati AB, Drago L, Bottagisio M, et al. Systemic and Local Administration of Antimicrobial and Cell Therapies to Prevent Methicillin-Resistant Staphylococcus epidermidis -Induced Femoral Nonunions in a Rat Model. *Mediators Inflamm.* 2016 (2016).
- Surdu-Bob CC, Coman C, Barbuceanu F, Turcu D, Berbaru N, Badulescu M. The influence of foreign body surface area on the outcome of chronic osteomyelitis. *Med. Eng. Phys.* 38(9), 870–876 (2016).
- Lovati AB, Romanò CL, Bottagisio M, et al. Modeling staphylococcus epidermidis-induced non-unions: Subclinical and clinical evidence in rats. *PLoS One.* 11(1) (2016).
- David Reinedahl, Silvia Galli, Tomas Albrektsson, Pentti Tengvall, Carina B. Johansson, Petra Hammarström Johansson, Ann Wennerberg. Aseptic Ligatures Induce Marginal Peri-Implant Bone Loss—An 8-Week Trial in Rabbits. *J. Clin. Med.* 2019, 8, 1248; doi:10.3390/jcm8081248.
- Tao H , Cong C, Zhiguo X, Gen L, Huiliang C, Xuanyong L, Chao Zhang, Yuqi Dong - A comparison of micro-CT and histomorphometry for evaluation of osseointegration of PEO-coated titanium implants in a rat model, *Nature Scientific Reports,* 7: 16270 , DOI:10.1038/s41598-017-16465-4
- Gehrke SG , Tiago Luis Eliers Treichel TLE, Letícia Pérez-Díaz L, Calvo-Guirado JL, Aramburú Júnior J , Patricia Mazón P, Piedad de Aza N - Impact of Different Titanium Implant Thread Designs on Bone Healing: A Biomechanical and Histometric - Study with an Animal Model *J. Clin. Med.* 2019, 8, 777; doi:10.3390/jcm8060777.

SCIENTIFIC REPORT 2020

ANNAFIB

Content

- Objectives in 2020
- Consortium objectives
- Objectives INCDMM Cantacuzino
- Summary of stage 2020
- Scientific and technical description
- Genetic characterization of the bacterial strain of MRSE
- Evaluation of the osseointegration of the Zimmer Dental Metal implant in the medullary area of the rabbit tibia
- Introduction of the Zimmer Dental Metal implant into the proximal trabecular area of the rabbit tibia
- Validation of osteomyelitis reproduction in rabbits using a bacterial strain of MRSE by medullary and trabecular inoculation
- Conclusions
- Bibliography

Objectives in 2020

Consortium objectives

- Peptide synthesis
- Production of metal implants loaded with PSF
- Determining the best antibiotics that can be integrated with peptides and then releasing them slowly
- Selecting the best treatment options
- Testing the chosen variants *in vitro*
- Starting animal studies to test the effectiveness of preventive treatment.

**Objectives of the National Institute for Medical-Military Development Research
„ Cantacuzino,,**

- Evaluation of the osteointegration study of the Zimmer dental implant in the rabbit tibia.
- Genetic characterization of the methicillin-resistant strain *Staphylococcus epidermidis* (MRSE);
- Validation of inducing the rabbit osteomyelitis MRSE strain in the trabecular bone marrow and the tibia

Summary of stage 2020

2020 year was COVID-19 characterized pandemic and has led to the postponement of one year of the project (all activities shifted accordingly).

The Galeazzo Orthopedic Institute in Milan, which is the coordinating institute, Was transformed into a COVID center, the research activity being canceled until August 2020. The Demokritos Institute in Athens was quarantined for 2 months, they managed to identify preventive treatment with slow-discharge antibiotics .

The following is the validation of the treatment by in vitro tests, the loading of the implants and the evaluation of the efficiency of the proposed treatment.

In these conditions Cantacuzino Institute genetically characterized strain of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* MRSE strains transmitted to its in 2019 by Project Coordinator (IOG).

The strain has a stable genetic profile for antibiotic resistance genes, virulence factors and surface proteins.

Started in 2019, the osteointegration study was completed in 2020 by imaging and histopathological evaluation.

The results showed that the dental implant used (Zimmer implant) is osseointegrated in the rabbit tibia, regardless of whether it is a simple implant or loaded with fibrin.

After transmitting the results, an implant was inserted into the trabecular area of the tibia in the proximal area to mimic exactly the human disease that sets in after the installation of prosthetic devices in the joint area.

The implant was fixed and showed osseointegration in that area as well.

Also for the same purpose to create a perfect translational model from rabbit to human, a study was conducted to induce osteomyelitis in rabbits by inoculating the bacterium in the optimal dose established in the 2019 experiment, respectively 5×10^8 CFU / ml, by medullary and trabecular inoculation.

In the area of animal testing of CI was created three groups of rabbits, control group, inoculated in the medullary area group and one group was inoculated into the trabecular bone marrow.

Each batch was split into two batches, one for the acute phase and a chronic phase of the disease.

The animals were monitored clinically, hematologically, and at the end of the evaluation period they were euthanized, samples were collected for microbiological and histological examination.

Ostiomyelitis occurred in over 75% of the inoculated rabbits in the acute phase and the viability is over 90 %.

Scientific and technical description

Genetic characterization of the bacterial strain of MRSE

The MRSE strain was transmitted by the project coordinating institution, IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi in Milan, Italy (IOG), on 3 plates, at the beginning of October 2019. The microbiology laboratory from CI, revitalized it from the plates that arrived and analyzed its characteristics being presented in the 2019 report. In order to distinguish the MRSE strain used in the induction of osteomyelitis, its genetic characterization was necessary.

Genetic characteristics - The genome sequences of the MRSE strain, GOI1153754-03-14, are stored in the International Gene Bank - DDBJ / ENA / GenBank, and the complete sequence can be found here - <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28522724>. First, amplified multi-locus typing regions (MLST) were sequenced, which is an unequivocal procedure for the characterization of isolated bacterial species (<https://pubmlst.org/sepidermidis/info/primers.shtml>). The aim was to identify genes present in the genome of clinically isolated bacterial strains that are not so common in *S. epidermidis* that generally contaminate the environment. Since there were no primers tested in our laboratory for this purpose, we decided to search the literature to find some important genes for identifying *S. epidermidis* strains. These genes are linked to virulence factors and antibiotic resistance. By amplifying these regions, *S. epidermidis* harvested from animals can be selected, but it is not enough to conclude with certainty that the strains are the inoculated ones. The only way to definitely match the bacteria extracted from animals with the inoculated ones is to sequence the bacterial genome and superimpose it with the inoculated genome of the clinically isolated bacterium, but this process is resource intensive and does not justify the overall purpose of the project. As genes of interest, the *icaA* and *icaD* genes were amplified. *Ica* locus is involved in the biofilm formation process and there are some (unfortunately not so many) MRSE strains without *ica* genes. Similarly, to differentiate MRSE, the *mecA* gene can be amplified (not as frequently as *ica*). Checking an article on Pubmed (PMID: 23705749), in which the authors amplified *S. epidermi* *icaA*, *icaD* and *mecA* genes, verified the primers that simulate a silico PCR with this online tool <http://insilico.ehu.es/PCR/index.php?mo=Staphylococcus> to confirm the ability of the three pairs of primers to amplify the sequences of the target genome and all work in silico. Briefly, the sequence of primer F and primer R and I was inserted, *S. epidermidis* RP62A (ATCC 35984) was selected

for reference. Furthermore, the primer sequences were associated with the genetically isolated clinical bacterium genome *S. epidermidis* for further confirmation. This strategy should work, the only difference I noticed is that the length of the *mecA* sequence is not 224 bp as reported in the paper, but longer (533 bp). Another parallel strategy that can be considered to strengthen PCR results is to assess resistance to a panel of antibiotics. The initial MIC values were also compared with those of the strain extracted from the animals in order to have further confirmation of the results.

In the microbiology laboratory, the MRSE solutions used in animal studies were prepared, in a concentration of 5×10^8 CFU / ml and the samples collected from animals were analyzed microbiologically.

Evaluation of the osseointegration of the Zimmer Dental Metal implant in the medullary area of the rabbit tibia

The experiment started in 2019, and the evaluation was completed in 2020.

Briefly, the experiment was performed as follows:

The study was evaluated and approved by the ethics committee and approved by the competent authority.

5 rabbits, New Zealand males, 3000-3500 g., were selected at the start of the study. The animals were individualized and marked.

Before starting the surgery, the animals were fed for 16-18 hours.

Surgery: the animals were deeply anesthetized; the fur was cut from the left and right hind limb in the tibia area and disinfected with iodine. A local anesthetic was also given. The skin and subcutaneous tissue were incised, followed by blunt dissection of the periosteum and exposure of the cortex. A cavity was created at the tibia, progressively, using 1mm, 1.5mm, 2mm, 2.5mm, 3mm, 3.5mm and 4mm drills. The whole process of creating the cavity was carried out under cooling with pure water, in a continuous jet. With a dental implant kit, the Zimmer trabecular dental implant was implanted as such empty and with fibrin (TMMB10 / TMMB10 + PSF) in the cavity of the left / right foot, then the fixing end was detached and the healing screw was mounted. Implantation was performed on both sides of the tibia. The suture of the wound operated with non-absorbable thread was practiced in 2-3 points in "U", over which a protective layer of Aluminum was applied. The operated limbs were protected by applying sterile compresses and a Pet-Flex bandage. All animals received postoperative analgesic treatment for 3 days and antibiotic treatment for 5 days.

The general clinical condition was assessed daily. For 5 days the animals were thermomatered daily. Weight was measured weekly.

Approximately 30 days after implantation, the animals were euthanized, euthanized, tibiae were harvested and sent for microCT imaging, then to the histopathology laboratory.

Imaging analysis

Imaging was performed with a Micro-CT (SkyScan 1172, Kontisch, Belgium).

The samples were placed vertically in a holder and scanned. The scan was performed at 56 kV and 100 μ A. The resolution of the slides was 26.85 μ m. 664 slides were made. The exposure time was 700 ms with a total scan time of 52.28 min (128 mAs).

No filters were used.

The images were reconstructed using the software NRecon v1.6.1.5 (Skyscan, Belgium). All data were exported in Dicom format and imported into Amira (Visage Imaging GmbH, Berlin, Germany) for evaluation. Because part of the implant was outside the bone, the data were cut along the axis of the implant to where the cortical bone began. Prior to segmentation, bone and implant threshold levels were determined based on visual inspection of complete slices and scale histogram. This was done by determining the upper and lower threshold levels for bone and implant in 5 samples for each type of implant. The bone and implant thresholds did not overlap and allowed a clear distinction to be made. The means were calculated and used for each sample. The threshold determination was repeated for the assessment of intra- and inter-examination repeatability.

Then, a region of interest (ROI) was defined, where the bone area (BA) was calculated. Therefore, the implant was selected based on its threshold level and this region was extended circumferentially, creating an area of 0.75 mm around the implant.

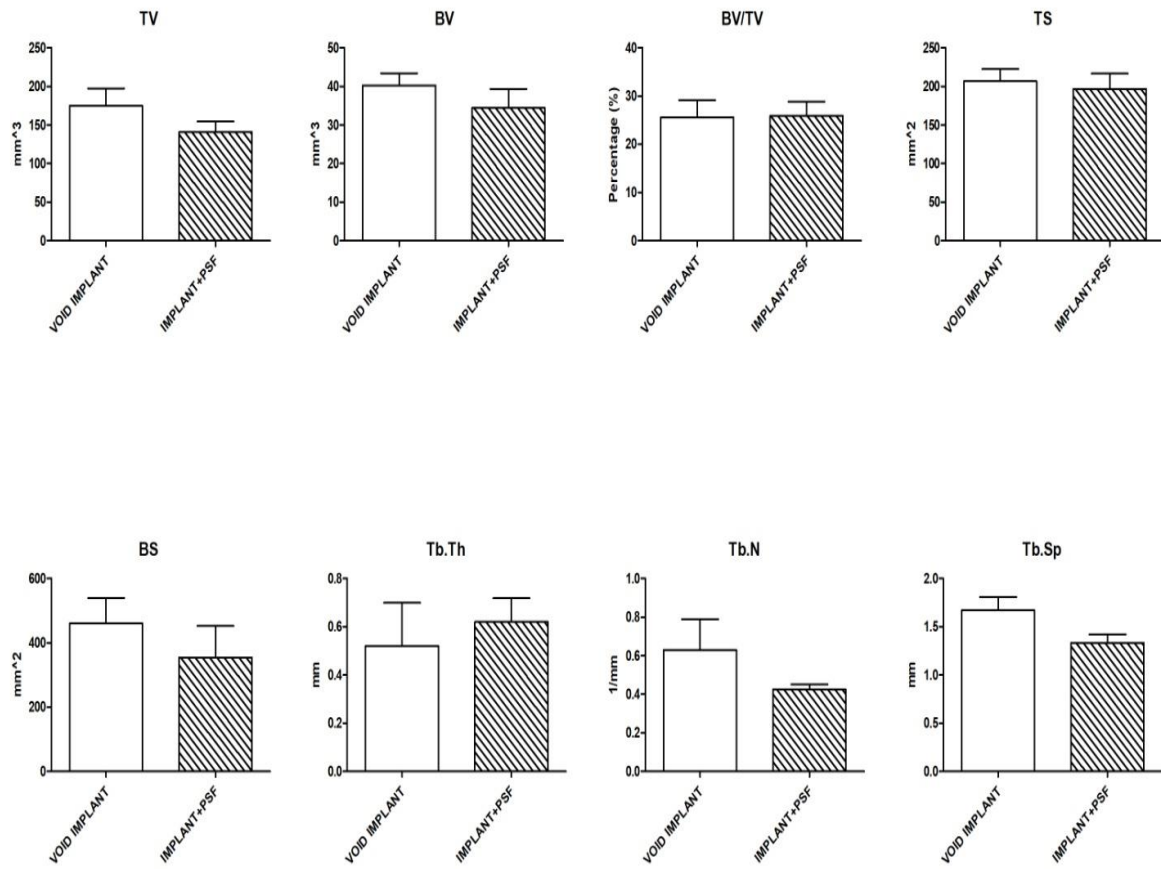
Subsequently, the implant and bone in ROI were differentiated according to their threshold levels, creating 3 volumes: implant, bone and soft tissue / voids. These were converted to the tetrahedral network of triangular surfaces, to make possible surface and volume measurements. The result variables were the bone area (BA), being the percentage of bone that is present in the region around the implant and BIC (Bone Implant Contact), being the area-percentage of the total area of the implant that is covered by bone.

The analyzed parameters were:

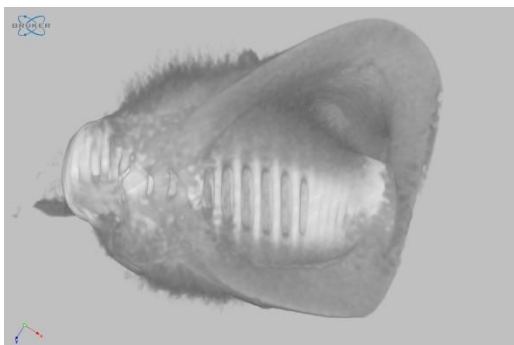
- BV / TV, fraction of trabecular bone volume;
- BMD, bone mineral density;
- TMD, tissue mineral density;
- Tb.N, trabecular number;
- Tb.Th, trabecular thickness;
- Tb.Sp, trabecular separation;

as well as all variations on the axes.

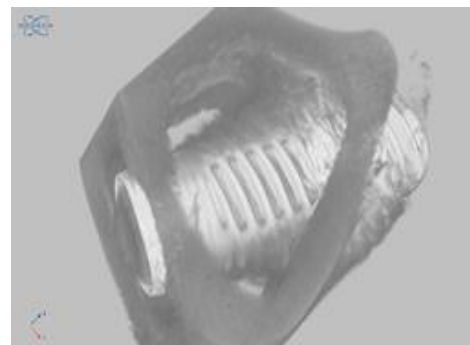
The graphical synthesis of the results is presented below. It was done by the Mann-Withney test.



3D image



Void implant

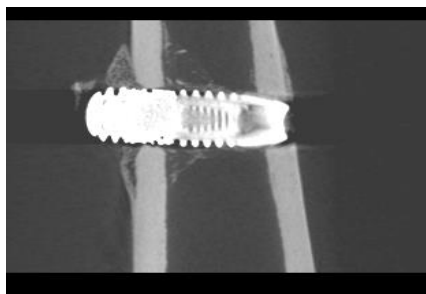


Fibrin implant

Axiale image

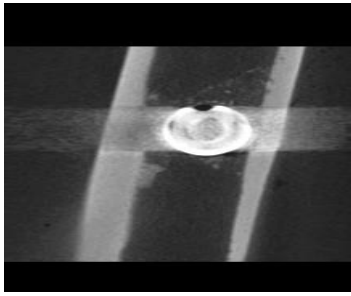


Void implant

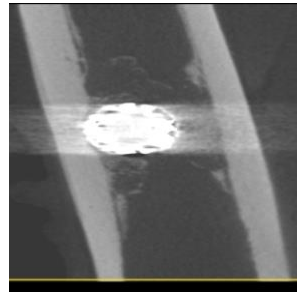


Fibrin implant

Sagitale image



Void implant



Fibrin implant

At 5 weeks after implantation, no significant differences were found in new bone tissue formation and imaging analysis of rabbit tibias implanted with hollow trabecular titanium implants and PSF-loaded implants. This means that the presence of fibrin does not alter the formation and penetration of bone into the trabecular spaces of Zimmer dental implants.

Histopathological analysis

The histological examination, performed for all tibias that were implanted, followed the specific protocol: fixation in 10% formalin solution, decalcification, implant extraction, dehydration in ethanol solution and incorporation of paraffins. The paraffin blocks were cut with the microtome to a thickness of 5 μm and stained with hematoxylin and eosin.

The evaluation looked at osteogenesis, cellularity, the effects of the implant on bone structure, as well as any other effects found.

Histological analysis and evaluation showed the existence of osteogenesis, the presence of bone cells (osteoblasts, osteoclasts) and the formation of the primary bone callus in the implant.

There are no side effects and no signs of infection were detected.

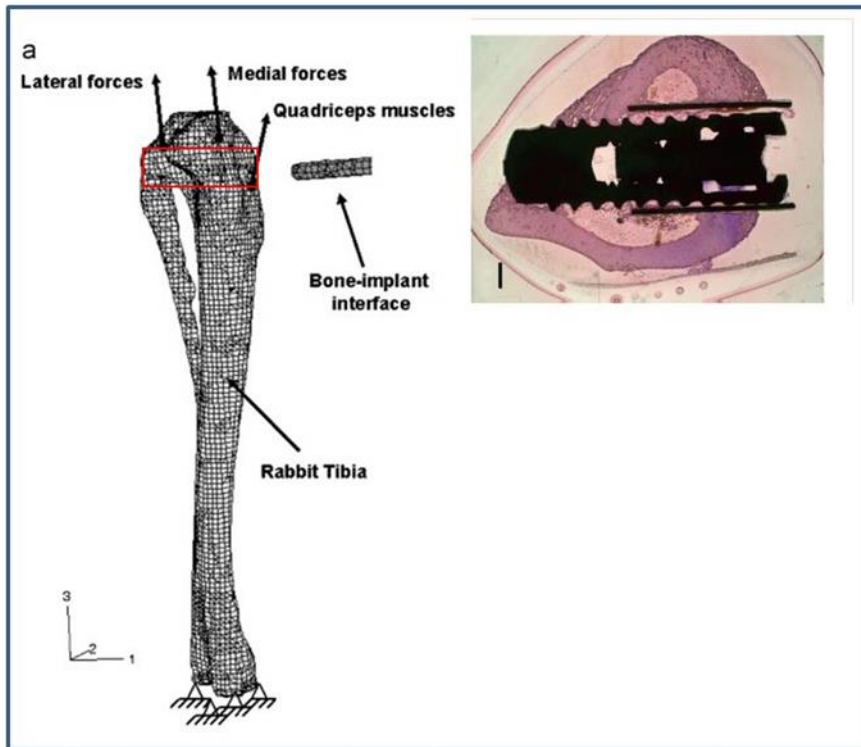
There is no lack of differences between the two types of implants. Implants are very well tolerated. In no case were there bone reactions of implant rejection, osteogenetic activity being present in all situations with small differences. We mention that the amorphous material present in some sections does not trigger an inflammatory / foreign body reaction.

The presence of fragments of necrotic bone tissue, sequestered in the periosteal and occasionally fibrous reaction in the bone cortex, is the occasional presence being correlated with the formation of compact bone sequestrations during surgical procedures of implant insertion.

In conclusion, we can say that implants ensure osseointegration and that there are no differences between the 2 types of implant.

Introduction of the Zimmer Dental Metal implant into the proximal trabecular area of the rabbit tibia

In order to validate the translation of osteomyelitis in humans, osteomyelitis induced by prostheses, the Zimmer implant was introduced in the trabecular area of the tibia.



Implantation technique:

On fully anesthetized rabbits it was performed in the tibia of the left leg of each animal, in the proximal trabecular area, using a 2.5 mm drill a bone defect at a distance of about 3 - 5 mm from the femur-tibio-patellar joint, immediately postoperatively for 3 days analgesics were treated in all rabbits.

After 6 weeks of monitoring, the animals were euthanized.

Physical evaluation of the implantation

Clinical evaluation revealed that implantation was performed in the trabecular area and can be used as a model for the reproduction of the disease in humans.

Validation of osteomyelitis reproduction in rabbits using a bacterial strain of MRSE by medullary and trabecular inoculation

The 2019 study was followed in 2020 by a study to validate the optimal concentration of MRSE capable of inducing osteomyelitis, respectively 5×10^8 CFU / ml by inoculating the intramedullary and trabecular bacteria.

This study was conducted on the basis of the OECD International Standard for Good Laboratory Practice (GLP) - ENV / MC / CHEM (98) 17.

animated

- Species / Strain: Rabbits / New Zealand White.

- Source: Laboratory Animal Husbandry - Cantacuzino Institute (INCDMM Cantacuzino).
- Gender: Males and females
- Body weight range over 2500 grams at the start of testing.
- Age: youth - adult, minimum 6 months.
- Acclimatization period: minimum 5 days.
- Total number of animals: 84
- Identification method:
 - for animals - ear marking.
 - for cages - label.

Animal management was similar to that in the 2019 study

The working method was

- creating bone defects
- MRSE inoculation
- pain management

All methods were similar to those of 2019 and 2020 (trabecular osteointegration study)

Monitoring animals and the evolution of the disease

Animal monitoring lasted a total of 30 days (14 days - acute, chronic 30 days)

Result

Survival rate: in this experiment a survival rate of 100% was recorded in all groups.

The analysis of the clinical signs made by observation and found during the experiment highlights the following:

Lot CM and CT - no clinical signs

Groups M - 2 rabbits showed abscesses approximately 7 days after the induction of the disease, abscesses that remained in various forms (suppurative or encapsulated) approximately 30 days after surgery; 2 rabbits had an open wound approximately 3 days after inoculation.

Groups T - 4 rabbits showed abscesses approximately 7 days after disease induction, abscesses that remained in various forms (suppurative or encapsulated) throughout the study.

Body weight was monitored by weighing the animals on a RADWANG scale.

The evolution of body weight was weight gain, at a higher rate in the control group.

Body temperature was measured using a digital thermometer, daily for the first 7 days and then weekly. The results do not show statistically significant changes.

Haematological tests were performed on an Idexx Procyte 5 Diff device, from blood collected on EDTA. The results show an increase in neutrophils and white line in general in animals inoculated with MRSE, thus showing a sign of infection.

Biochemical examinations performed on a VetTest analyzer on general health reagents showed an increase in renal and hepatic parameters in animals inoculated with MRSE, but without being significant.

The microbiological examination was performed on bone tissue samples collected from the tibia inoculation (medullary or trabecular) and on blood samples to identify MRSE by blood culture and on samples collected from various organs with macroscopic lesions. Isolation of bacterial strains was performed from non-incubated tissue samples, tissue samples incubated 24 h at $36 \pm 10^\circ \text{C}$ with 5 mL BHI medium and from blood cultures incubated for 7 days at $36 \pm 100 \text{C}$. To accurately confirm the microbiological diagnosis, on In addition to the MALDI-TOF identification, the sensitivity profiles obtained by the diffusimetric antibiogram were compared to an extended set of antibiotics of the SCN strains isolated from samples ID17 - ID43, with that of the inoculated MRSE strain.

Microbiological examination results

No MRSE strain with a resistance profile similar to the MRSE strain used to inoculate rabbits was identified in the analyzed samples.

The diversity of species isolated from the analyzed samples, including samples collected from rabbits in the control group, as well as the heterogeneity of antibiotic resistance profiles (*S. pastures* with 3 different ASTs, *S. epidermidis* with 2 different ASTs, etc.), suggest possible contamination of samples or lesions caused by inoculation with the MRSE *Staphylococcus epidermidis* strain.

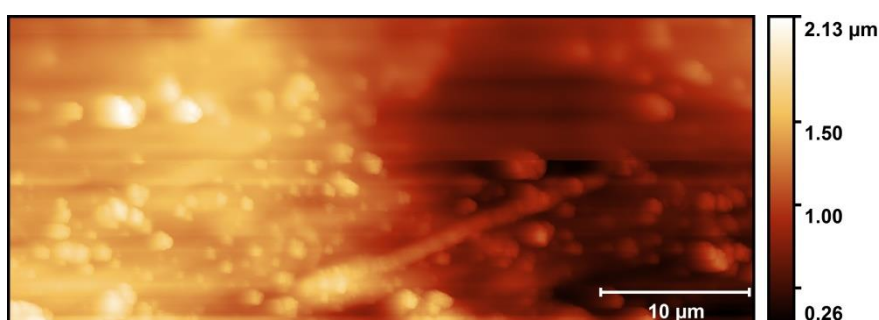
The fact that several bacterial species could be identified after ultrasound of the samples proved the superiority of the technique over simple vortexing.

Immunological evaluation was performed by analysis of pro and anti-inflammatory cytokines. The results show the existence of cytokines at an average level with a difference that is not statistically valid. However, some cytokines were not detectable. In the case of these analyzes, it is necessary to take a different approach to collecting samples, not only at the end of the study, as has been done now.

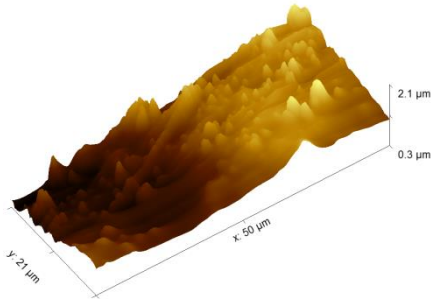
Evaluation by the atomic force microscope

Through this evaluation we aimed to see if biofilm was formed on the outer and / or inner surface of the bone.

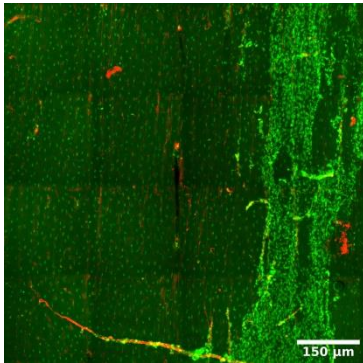
The captured images are below:



AFM_Topography_orto



AFM_topography_side



Fluorescence

Fluorescence - DAPI color fluorescence image for nuclei (green) and eosin for proteins (red), covering a 0.8 * 0.8mm bone surface in a region containing both periosteum (right) and exposed bone (left). The image is reconstructed in plan from 16 frames on XY and 20 on Z (covering 200um).

AFM_Topography_orto - AFM topography image on an area of 20x50 micrometers; the color represents the height on Z.

AFM_topography_side - the same image, seen from the side;

Based on the fluorescence image, regions of the sample containing bacterial biofilms (DAPI and eosin staining) can be identified and then targeted on those areas with AFM to characterize the biofilm (thickness, bacterial density, adhesion fibers, etc.).

No such areas were found, probably on implants, if biofilm is formed they will be identified.

The necropsy was performed on euthanized rabbits according to the study protocol.

Lots C: No macroscopic changes

Lots M: Necropsy examination revealed lesions in the tibia operated on 65% of operated rabbits

Groups T: Necropsy examination revealed lesions in the tibia operated on 76% of operated rabbits

Histopathological examination

After decalcification of the tibias, staining was done with H&E.

The observed lesions showed in the groups inoculated with MRSE especially granulomatous inflammatory reactions of foreign body with the presence of coccoid bacteria grouped in colonies and distorted compact, lamellar fragments of bone with regenerative phenomena (proliferation of osteoblasts) delimiting bone fragments, additional connective tissue fibrous that strengthens the defect area. Fragments of mesa, fibrous connective tissue, foreign body reaction and hematopoietic tissue islands are observed in the medullary canal. All this confirms the onset of osteomyelitis.

In conclusion, we can say that clinical signs, microbiological and histological results were observed, the rest of the analyzes will be refined together with the main experiment to evaluate the preventive capacity of the treatment included in the implant.

Conclusions

- The MRSE strain to be used in the studies was genetically characterized.
- The implant to be used in the main study develops osseointegration in both the medullary and trabecular area of rabbit tibia in both types of implant (hollow and fibrin).
- Induction of osteomyelitis with a dose established by MRSE, of 5×10^8 CFU / ml, at the medullary and trabecular level can be achieved, but a more careful planning of the sampling is necessary when the main study to evaluate the treatment against osteomyelitis will be performed.

References

- Bottagisio, M., Soggiu, A., Lovati, A. B., Toscano, M., Piras, C., Romanò, C. L., Bonizzi L., Roncada P., Drago, L. (2017). Draft genome sequence of *Staphylococcus epidermidis* clinical strain GOI1153754-03-14 isolated from an infected knee prosthesis. *Genome Announcements*, 5(20). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00378-17>.
- OECD - ISO 10993-2, Biological evaluation of medical devices Part 2: Animal welfare requirements, 2016.
- LEGEA nr. 43 din 11 aprilie 2014 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice, actualizată, 2019.
- Coman C, Surdu-Bob C, Turcu D, Vlase E, Oporanu M, Badulescu M. Evaluarea clinică și microbiologică a unui model de osteomielită umană. *Rev. Rom. Med. Vet.* 2013; 2: 65-72.
- Bottagisio M, Coman C, Lovati AB. Animal models of orthopaedic infections. A review of rabbit models used to induce long bone bacterial infections. *J Med Microbiol.* 2019;68(4):506-537.
- Ramasamy M, Lee J. Recent Nanotechnology Approaches for Prevention and Treatment of Biofilm- Associated Infections on Medical Devices Recent Nanotechnology Approaches for Prevention and Treatment of Biofilm-Associated Infections on Medical Devices. *Biomed Res. Int.* (2016:1851242.) (2016).
- Shah SR, Tataru AM, D'Souza RN, Mikos AG, Kasper FK. Evolving strategies for preventing biofilm on implantable materials. *Mater. Today.* 16(5), 177–182 (2013).

- Lovati AB, Bottagisio M, Vecchi E De, Gallazzi E, Drago L. Animal models of implant-related low-grade infections. A twenty-year review. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. (2017).
- Lovati AB, Romanò CL, Bottagisio M, et al. Modeling staphylococcus epidermidis-induced non-unions: Subclinical and clinical evidence in rats. *PLoS One*. 11(1) (2016).
- Lovati AB, Drago L, Bottagisio M, et al. Systemic and Local Administration of Antimicrobial and Cell Therapies to Prevent Methicillin-Resistant Staphylococcus epidermidis -Induced Femoral Nonunions in a Rat Model. *Mediators Inflamm*. 2016 (2016).
- Surdu-Bob CC, Coman C, Barbuceanu F, Turcu D, Bercaru N, Badulescu M. The influence of foreign body surface area on the outcome of chronic osteomyelitis. *Med. Eng. Phys.* 38(9), 870–876 (2016).
- Lovati AB, Romanò CL, Bottagisio M, et al. Modeling staphylococcus epidermidis-induced non-unions: Subclinical and clinical evidence in rats. *PLoS One*. 11(1) (2016).
- David Reinedahl, Silvia Galli, Tomas Albrektsson, Pentti Tengvall, Carina B. Johansson, Petra Hammarström Johansson, Ann Wennerberg. Aseptic Ligatures Induce Marginal Peri-Implant Bone Loss—An 8-Week Trial in Rabbits. *J. Clin. Med.* 2019, 8, 1248; doi:10.3390/jcm8081248.
- Tao H , Cong C, Zhiguo X, Gen L, Huiliang C, Xuanyong L, Chao Zhang, Yuqi Dong - A comparison of micro-CT and histomorphometry for evaluation of osseointegration of PEO-coated titanium implants in a rat model, *Nature Scientific Reports*, 7: 16270 , DOI:10.1038/s41598-017-16465-4
- Gehrke SG , Tiago Luis Eliers Treichel TLE, Letícia Pérez-Díaz L, Calvo-Guirado JL, Aramburú Júnior J , Patricia Mazón P, Piedad de Aza N - Impact of Different Titanium Implant Thread Designs on Bone Healing: A Biomechanical and Histometric - Study with an Animal Model *J. Clin. Med.* 2019, 8, 777; doi:10.3390/jcm8060777.

RAPORTARE ȘTIINȚIFICĂ 2021

Obiective an 2021

Obiective consorțiu :

- Producerea de implanturi metalice încărcate cu fibrină și cu fibrin+antibiotice ;
- Testarea *in vitro*;
- Demararea studiilor pe animale de testare a eficienței tratamentului preventive și curative: pe șobolan la Institutul Ortopedico Galeazzo din Italia și pe iepuri și oi la Institutul Cantacuzino, București.

Obiective Institutul Național de Cercetare Dezvoltare Medico-Militară „Cantacuzino,, :

- Crearea și aplicarea tratamentului în modelul experimental de osteomielita la iepuri și berbeci prin
 - Inducerea fazei acute și cronice de osteomielita și aplicarea tratamentului la iepuri și
 - Inducerea osteomielitei la berbeci și aplicarea implanturilor cu tratament

Rezumatul etapei 2021

Anul 2020 caracterizat prin pandemia de COVID 19 a determinat amânarea cu 1 an a derulării proiectului, toate activitățile fiind decalate corespunzător. În plus s-a impus și modificarea unor activități, respectiv renunțarea la modelul animal suin și transferul pe un model ovin, motivul fiind costurile prea mari ale modelul suin. O altă modificare a fost preluarea activităților de achiziție, îngrijire, etc. a ovinelor de către Institutul Cantacuzino, urmând ca analizele finale (microtomografie, histopatologie prin înglobarea în rășină și histomorfometrie) să se facă la Universitatea din Tel Aviv, Israel. În schimbul acestor servicii Universitatea din Tel Aviv a preluat și tibiile de iepure pentru aceleași analize finale. Rezultatele finale vor fi disponibile în 2022.

În aceste condiții Institutul Cantacuzino a efectuat integral experimentele pe iepuri, creînd un model de prevenție a osteomielitei acute, prin aplicarea tratamentului odată cu bacteria și a indus osteomielita cronică aplicând apoi tratamentul prin implanturile încărcate cu fibrină, nanoparticole și antibiotice.

Deasemenea, s-au achiziționat ovinele și s-a creat modelul experimental de implantare și inducere a osteomielitei și peri-implantitei, studiul fiind încă în desfășurare.

Descrierea științifică și tehnică

Declarația etică

Studiile pe animale au fost avizate favorabil încă din anul 2019 de către comisia de etică a INCDMM Cantacuzino (CI), aviz favorabil nr 351/13.08.2019 și autorizate de către autoritatea competentă, autorizație de proiect nr. 471/02.10.2019. În 2021 am întocmit și

depus dosarul de autorizare a studiilor pe ovine, experimentele au fost avizate favorabil de către comisia de etică a INCDMM Cantacuzino (CI), aviz nr 43/13.04.2021 și autorizate de către autoritatea competentă, autorizație de proiect nr. 625/17.05.2021. Toate experimentele s-au efectuat cu respectarea normelor de îngrijire și utilizare animalelor folosite în scopuri științifice stabilite de reglementările naționale și europene și aplicarea principiilor 3R. Studiile s-au făcut în INCDMM Cantacuzino, Stațiunea Băneasa, Unitatea de Testare Preclinică (SB), unitate autorizată ca unitate utilizatoare de către autoritatea competentă.

Evaluarea tratamentului novativ cu nanoparticule în prevenirea osteomielitei acute induse cu MRSE la iepuri

Scopul acestui studiu a fost evaluarea tratamentului novativ cu nanoparticule în prevenirea osteomielitei acute induse cu MRSE la iepuri.

Pentru acest experiment s-a utilizat tulpina de Staphylococcus Epidermidis Methicilin Rezistent - MRSE izolat de la nivelul unei proteze infectate dispusă la genunchi, în concentrație de 6×10^8 UFC/ml. Bacteria în concentrația stabilită a fost pregătită în ziua inoculării în Stațiunea Băneasa, evitându-se astfel transportul.

Tratamentul novativ a fost încărcat în implanturi dentare de următoarele tipuri:

- Implanturi ca atare - M
- Implanturi nanofuncționalizate cu PSF/NCSR#9 (grup de control) - C
- Implanturi nanofuncționalizate cu PSF/NCSR#11HL (grup de tratament cu vancomicină) – T

S-au selectat 54 iepuri adulți, Noua Zeelandă masculi și femele, greutatea corporală peste 2500 gr. în momentul începerii studiului. Animalele au fost individualizate și marcate. Animalele au fost împărțite în 3 loturi astfel :

Lot	Animale pe lot	Proceduri de efectuat
M	18	Crearea de defect osos în zona trabeculară și introducerea implant gol imersat în MRSE (5 ore), conc 6×10^8 UFC/ml. Urmărirea animalelor timp de 14 zile.
C	18	Crearea de defect osos în zona trabeculară și introducerea implanturi nanofuncționalizate cu PSF/NCSR#9 imersat în MRSE (5 ore), conc 6×10^8 UFC/ml. Urmărirea animalelor timp de 14 zile.
T	18	Crearea de defect osos în zona trabeculară și introducerea implanturi nanofuncționalizate cu PSF/NCSR#11HL imersat în MRSE (5 ore), conc 6×10^8 UFC/ml. Urmărirea animalelor timp de 14 zile.

Tehnica de implantare :

Pe iepurii anesteziati total s-a realizat în tibia piciorului stâng a fiecărui animal, în zona trabeculară proximală, s-a creat o cavitate la nivelul tibiei, în mod progresiv, folosind burghiu de 1mm, 1,5mm, 2mm, 2,5 mm, 3mm, 3,5mm și 4mm. Întreg procesul de creare a cavității s-a realizat sub răcire cu apă pură, în jet continuu. În defectul osos s-a pus implantul și pe lângă el s-a inoculat bacteria. Peste defectele osoase s-a pus un adeziv osos-stomatologic. Operația s-a închis prin practicarea suturii în 2-3 puncte separate

folosind fir neresorbabil. Peste plaga astfel închisă s-a aplicat un strat protector de Aluminiu, comprese sterile și pansament tip Pet-Flex. Imediat postoperator timp de 3 zile s-a făcut un tratament cu analgezice la toți iepurii.

Studiul a durat 14 zile, după acest interval animalele au fost eutanasiate și s-au recoltat tibiile.

Animalele au fost monitorizate zilnic pentru starea generală de sănătate prin observație urmărindu-se:

- starea generală,
- letargie,
- inapetenta,
- schiopături.

S-au monitorizat zilnic semnele locale la locul inoculării și apoi săptămânal urmărindu-se:

- eritem
- umflături moi moderate, mari
- puroi sau exudarea puroiului

• Animalele au fost cântărite la Z0, Z7, Z14

• S-a recoltat sânge preoperator și postoperator la Z1, Z3, pentru efectuarea examenului hematologic și pentru obținerea de ser pentru examen imunologic.

• Examenе imunologice:

- Proteina C reactivă
- Interleukine

• Examen necropsic: la animalele moarte în timpul experimentului, eutanasiate în timpul studiului și la datele stabilite. S-a urmărit:

- țesutul moale și cavitatea intramedulară/trabeculară evaluate pentru puroi,
- formarea abcesului,
- drenarea sinusurilor,
- liza corticală,
- mal-union și non-unire.

S-a trimis tibia spre prelucrare la laboratorul de microbiologie. Se urmărește:

- Identificare bacteriilor,
- Numarat CFU.

• Examen de microcomputer tomograf și ulterior prelucrare histologică prin includere în rășină. Analiza datelor.

Rezultate

Procentul de supraviețuire: în acest experiment s-a înregistrat un procent de supraviețuire de 100% la toate loturile.

Analiza semnelor clinice făcute prin observație și constatate în timpul experimentului nu a evidențiat semne clinice la nivelul operațiilor

Evoluția greutății corporale a fost de creștere a greutateii, într-un ritm mai mare la lotul de tratament.

Temperatura corporală s-a măsurat folosind un termometru digital, iar rezultatele nu evidențiază modificări statistice semnificative.

Analizele hematologice s-au făcut pe un aparat Idexx Procyte 5 Diff, din sânge recoltat pe EDTA. Între cele 3 loturi rezultatele nu au aratat diferențe statistice semnificative.

Examenul microbiologic a fost efectuat pe probele au fost primite și au fost lucrate în hotă, cu instrumentar steril. Totuși, anumite instrumente (tăietorul de oase) nu au putut fi sterilizat de la probă la probă și a fost doar decontaminat cu alcool. Mai întâi a fost identificat implantul.

La început, s-a încercat obținerea de probe din mai multe zone din și de pe lângă implant: peri-implant, măduva hematogenă, capul distal al tibiei.

Dar, în mod consecvent, rezultatele cele mai bune s-au obținut intrând cu zona „fir” (mai subțire) a ansei pe canal (volum aproximativ preluat – 0.5 - 1 uL).

După ce s-a explorat cu ansa fir și s-a izolat o bucată de os cu implantul, acesta s-a introdus în 10 mL de ser fiziologic steril. S-a vortexat 2 minute, apoi s-a sonicat (baie cu ultrasunete) timp de 5 minute, urmând de o nouă vortexare de 2 minute. Din supernatant, câte 100 uL s-a însămânțat pe mediu de cultură și s-au numărat coloniile.

Toate tulpinile evaluate au fost identificate MALDI-TOF-MS ca *S. epidermidis* și au prezentat antibiograma „MRSE”, cu rezistența specifică fluorochinolone, aminoglicozide, trimetoprim, bisepтол.

Rezultatele sunt evidențiate în tabelul de mai jos

Lot	Fir 1	Fir 2	Sonicat 1	Sonicat 2	Sonicat 3	Median
C 32	378	291	61	26	54	54
C 33	340	208	67	60	71	67
C 22	98	103	37	41	39	39
C 24	353	27	32	19	27	27
M4	0	0	0	0	0	0
M5	0	0	0	0	0	0
M6	0	0	6	8	5	6
T 39	0	0	0	0	0	0
T 40	0	0	3	0	0	0
T 41	0	0	0	0	0	0
T 42	0	0	0	0	0	0

Rezultatele evidențiază identificarea MRSE la loturile C și M (în cantitatea mai mică și doar la un iepure), dar nu și la lotul ce a primit tratament.

3 fotografii cu coloniile de MRSE sunt prezentate mai jos.

Lot C



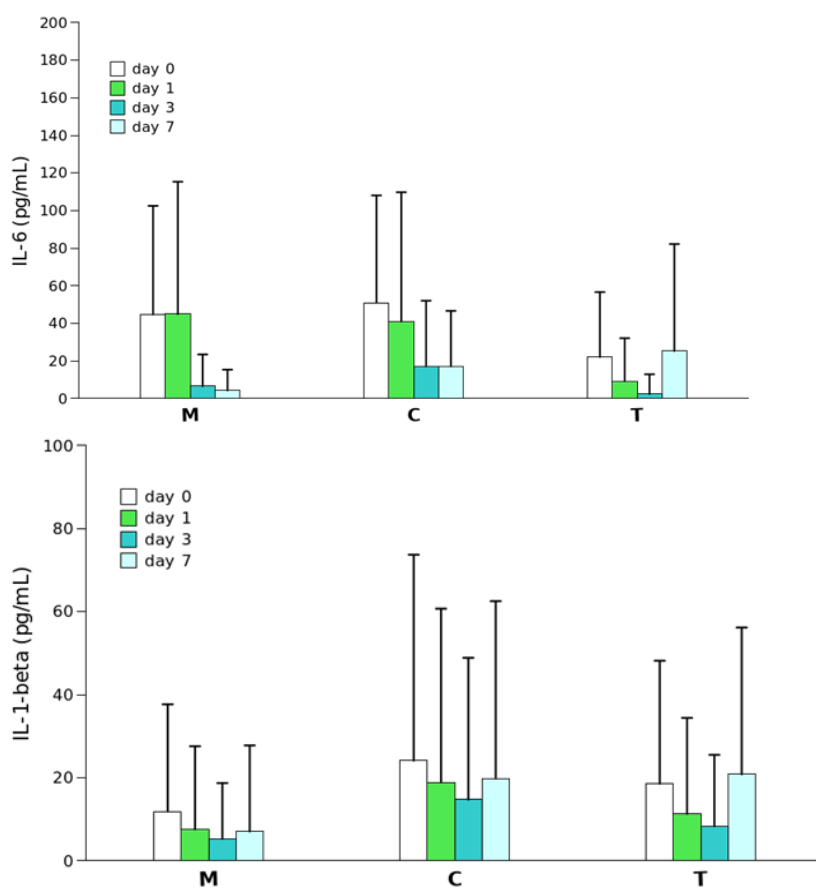
Lot M

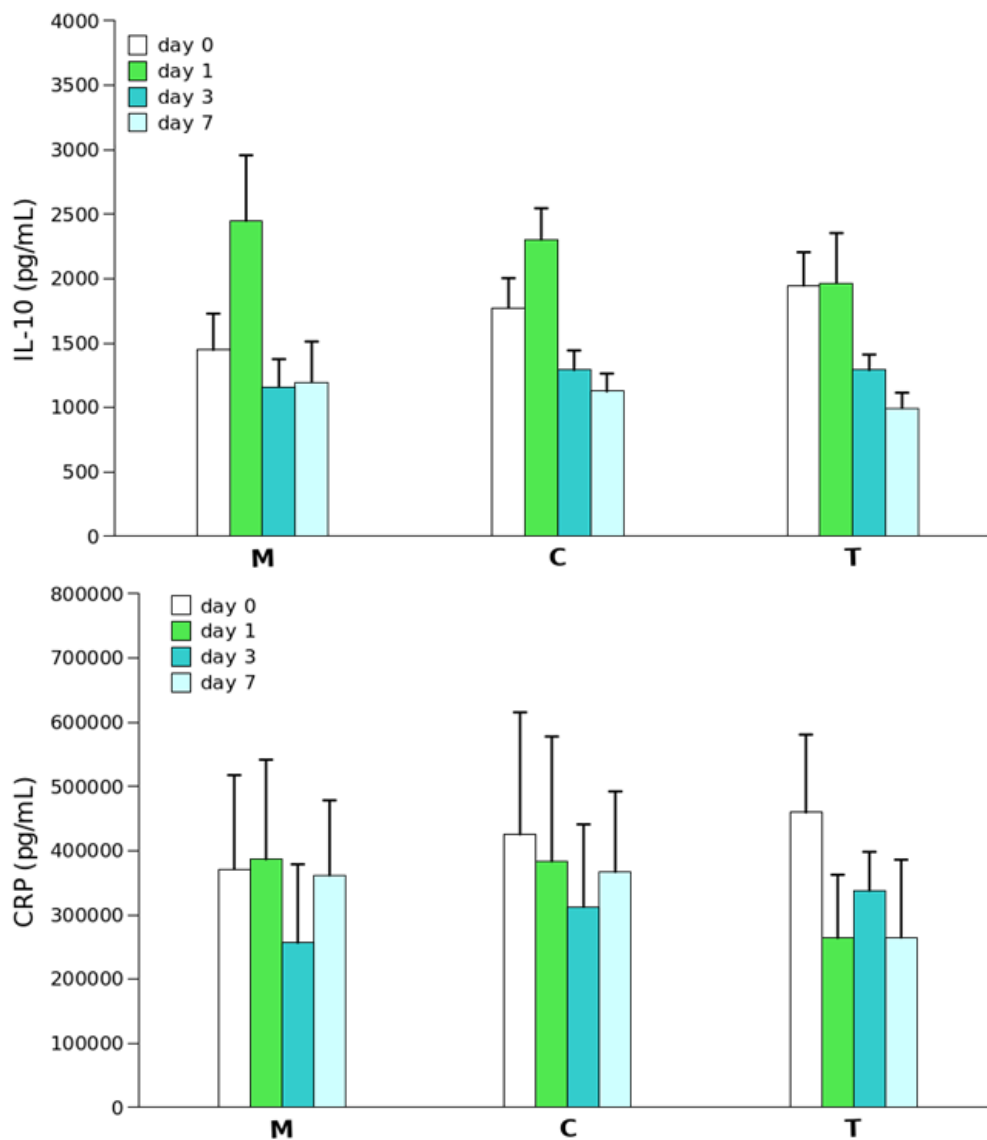


Lot T



Evaluarea citokinelor a evidențiat faptul că imunoglobulinele au scăzut după ziua 0, scădere determinată de inocularea de antinflamatoare, ulterior însă valoarea cea mai mare a fost la ziua 1, acestea scăzând ulterior. Analiza cea mai fidelă, respectiv proteina C reactivă arată o evoluție favorabilă a infecției la lotul T și diferențe semnificative statistic față de celelalte loturi, așa cum se poate vedea în graficele de mai jos.





Pe baza rezultatelor de până acum, în special a celor imunologice și microbiologice putem spune ca tratamentul previne instalarea osteomielitei, însă rămâne ca rezultatele să fie confirmate de celelalte analize, respectiv microtomografia, histopatologia și histomorfometria.

Evaluarea tratamentului novativ cu nanoparticule în tratatrea osteomielitei cronice induse cu MRSE la iepuri

Scopul acestui studiu a fost evaluarea tratamentului novativ cu nanoparticule în tratatrea osteomielitei cronice induse cu MRSE la iepuri.

Pentru acest experiment s-a utilizat tulpina de Staphylococcus Epidermidis Methicilin Rezistent - MRSE izolat de la nivelul unei proteze infectate dispusă la genunchi, în concentrație de 6×10^8 UFC/ml. Bacteria în concentrația stabilită a fost pregătită în ziua inoculării în Stațiunea Băneasa, evitându-se astfel transportul.

Tratamentul novativ a fost încărcat în implanturi dentare de următoarele tipuri:

- Implanturi ca atare - M
- Implanturi nanofuncționalizate cu PSF/NCSR#9 (grup de control) - C
- Implanturi nanofuncționalizate cu PSF/NCSR#11HL (grup de tratament cu vancomicină) – T

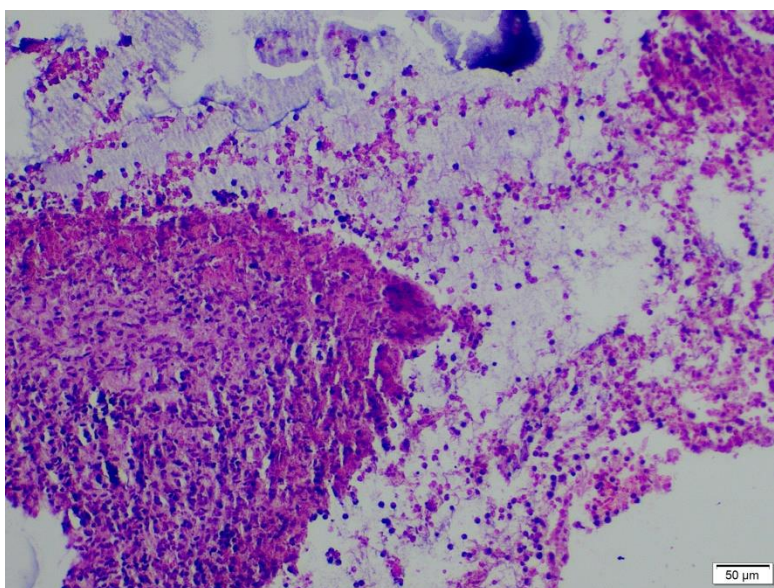
S-au selectat 54 iepuri adulți, Noua Zeelandă masculi și femele, greutatea corporală peste 2500 gr. în momentul începerii studiului. Animalele au fost individualizate și marcate.

Acest studiu a avut 2 etape :

- Inducerea osteomielitei
- Aplicarea implanturilor

Inducerea osteomielitei s-a făcut ca în celelalte studii, respectiv prin crearea defectului osos și aplicarea meșelor de tifon îmbibate în prealabil în soluția de MRSE.

Animalele au fost monitorizate clinic, iar după 3 săptămâni, am eutanasiat 3 iepuri pentru confirmarea instalării osteomielitei. Evaluarea microbiologică histopatologică a confirmat instalarea osteomielitei cronice, așa cum se poate vedea din figura de mai jos



Tibie cu osteomielită cronică

Apoi s-a trecut la a II-a etapă. Pe animalele anesteziate total s-a deschis operația, s-a scos meșa de tifon și s-a aplicat implantul.

Animalele au fost împărțite în 3 loturi, randomizat astfel :

Lot	Animale pe lot	Proceduri de efectuat
M	17	Crearea de defect osos în zona trabeculară și introducerea implant gol,
C	17	Crearea de defect osos în zona trabeculară și introducerea implanturi nanofuncționalizate cu PSF/NCSR#9
T	17	Crearea de defect osos în zona trabeculară și introducerea implanturi nanofuncționalizate cu PSF/NCSR#11HL

Animalele au fost monitorizate timp de 5 săptămâni, acesta fiind considerat timpul minim de osteointegrare conform studiilor anterioare monitorizarea s-a făcut ca în studiul 7.2 cu excepția citokinelor, la care s-a considerat că nu apar rezultate în infecțiile cronice.

La sfârșitul studiului animalele au fost eutanasiate și s-a recoltat tibia pentru examenul de microcomputer tomograf și ulterior prelucrare histologică prin includere în rășină.

Rezultate

Procentul de supraviețuire: în acest experiment s-a înregistrat un procent de supraviețuire de 100% la lotul T, 90% la lotul C și M.

Analiza semnelor clinice făcute prin observație a evidențiat semne clinice la nivelul operațiilor la un procent de 5% dintre iepurii la care s-a inoculat MRSE. Semnele clinice manifestate în special local prin abcese.

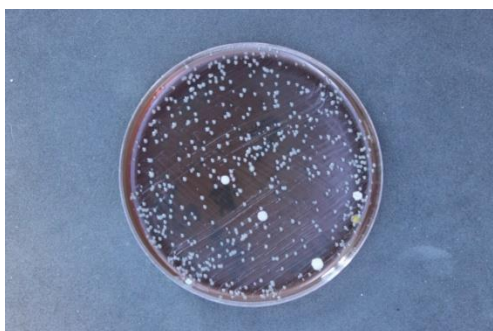
Evoluția greutății corporale a fost de menținere a greutateii.

Analizele hematologice nu au aratat diferențe statistic semnificative între loturi.

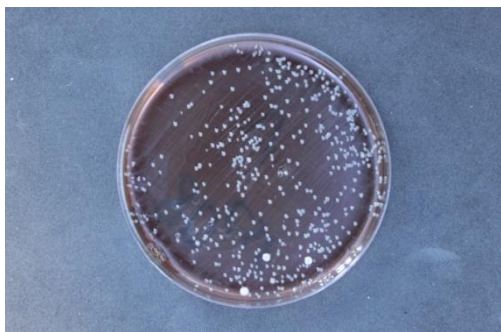
Analizele microbiologice s-au făcut după același protocol ca la studiul 7.2, iar rezultatele sunt evidențiate mai jos

ID	Fir 1	Fir 2	Sonicat 1	Sonicat 2	Sonicat 3
72 M	62	84	600	600	700
73 M	56	76	700	550	600
74 M	52	89	500	550	450
80 C	12	18	350	250	300
81 C	34	45	300	300	250
82 C	33	27	400	450	300
102 T	0	0	0	0	0
103 T	0	0	0	0	0
104 T	0	0	0	0	0

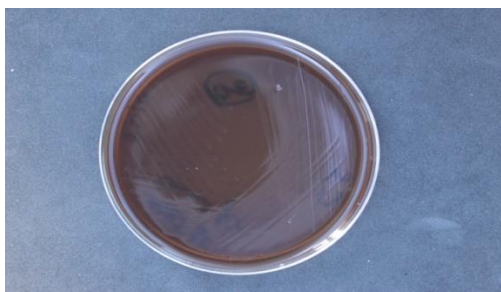
Lot C



Lot M



Lot T



Rezultatele experimentelor pe iepuri, acut prevenție și cronic tratament, au arătat prin prisma analizelor microbiologice corelate cu cele clinice că loturile la care s-a aplicat tratamentul nanofuncționalizat cu antibiotic au rezultate pozitive față de celelalte loturi.

Rămâne ca analizele cele mai sensibile, microCT și histopatologia să confirme aceste premize.

Evaluarea tratamentului nanofuncționalizat cu antibiotice în osteomielite și periimplantita indusă la ovine.

Pentru acest studiu s-au folosit ovine, rasa Țigaie, vârsta 4,5 – 5 ani, gura încheiată complet, stare de sănătate perfectă. Oile au fost achiziționate de la o fermă specializată din Ungaria. S-a renunțat la utilizarea de berbeci, deoarece coarnele lor împiedică efectuarea operațiilor chirurgicale.

După 30 de zile de carantină și de acomodarea s-a procedat la extracția primilor 2 premolari de pe toate 4 cadranele gurii. Înainte de efectuarea extracțiilor toate animalele au fost puse la dieta atât de hrană cât și de apă timp de 12 ore și au primit o doză de antibiotic (Enrofloxacin).

Anestezie: premedicație cu Dexmedetomidină și Ketamina IM. După 30 de minute a fost administrat Propofol IV, apoi animalul a fost intubat, iar anestezia a fost menținută cu izofluran 3%.

Tehnica chirurgicală: animalul a fost așezat în decubit lateral și din fiecare arcadă semidentară (sus-jos, stanga-dreapta) s-au extras primii doi premolari. Prima fază a constat în dislocarea fiecărui dinte cu ajutorul unui dislocator și apoi extragerea lui cu cleștele. În unele situații, când inserarea elevatorului între premolari a fost dificilă din cauza spațiului interdental mic, atunci am folosit un tăietor conic pentru a crea șanțuri interdentalare folosite ca pârghie de ridicare. În alveola rămasă s-a introdus un burete hemostatic și acolo unde cavitatea era foarte mare, gingia a fost suturată cu fir 3/0 resorbabil.

Animalele, post-extracție, au fost perfuzate cu soluție salină 0,9% și au primit tratament antiinflamator (Meloxicam 0,5 mg/kg) 3 zile și antibiotic (Enrofloxacin 2,5 mg/kg) 5 zile. Timpul de vindecare după extracție a fost de 3 luni.

Câteva poze de la operația de extracție sunt inserate mai jos





După o perioadă de vindecare de 3 luni s-a trecut la implantarea implanturilor, operație făcută de 3 specialiști de la Universitatea din Tel Aviv, Israel. Înainte însă s-a făcut un examen de computer tomograf

Deși inițial, în protocol se stabilizase ca să se implanteze în fiecare cadran câte un tip de implant (1) pure MI; 2) MI+PSF; 3) MI+ANF-PSF) s-a reușit implantarea în 4 cadrane doar la 3 oi. Din motive anatomice și tehnice, cum ar fi țesutul moale extrem de gros, tipul de os, disponibilitatea redusă a osului, perforarea cavitațiilor nazale și sinusurilor cu extrema implanturilor, dificultate extremă de a plasa implanturi în partea superioară. maxilar, s-a decis, împreună cu echipa de medici veterinari a Institutului Cantacuzino, amplasarea implanturilor la restul de 7 animale doar în maxilarul inferior. În consecință, au fost plasate doar 6 implanturi în fiecare dintre cele șapte animale rămase, câte 3 pe fiecare semi-mandibulă.

În acest moment, ținem să menționăm, că legătura dintre implanturi și matricele Silk Fibroin era extrem de slabă, deja în momentul preluării implantului din punca de sterilizare, fără niciun contact cu niciun instrument, învelișul era desprins parțial de implant. Evident, un eveniment similar ar putea fi apreciat în momentul plasării

implantului, unde particulele de acoperire ar putea fi văzute pe suprafața osului. Nu putem evalua numărul de implanturi în care acest lucru a fost evident sau cantitatea de matrice de fibroină de mătase care a rămas efectiv pe suprafețele implanturilor după inserția lor completă în os. Imediat după inserarea implantului, pe toate implanturile au fost plasate bonturi netede de vindecare și zona suturată cu fire resorbabile.

Vindecarea a fost fără evenimente majore, iar animalele au continuat în regimul lor normal.

Cîteva fotografii de la implantare sunt mai jos





La aproximativ 5 săptămâni de la inserarea implantului, am început inducerea infecției periimplantare. Înainte de începerea inoculării, am făcut un nou examen CT pentru a vedea stadiul vindecării zonei de implant.

Bacteria aleasă a fost *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (AA) este o bacterie Gram-negativă, anaerobă facultativă, imobilă, care se găsește adesea în asociere cu parodontoza agresivă localizată, o infecție severă a parodonțiului.

Prepararea bacteriei în soluția de inoculat s-a făcut la sediul central al Institutului Cantacuzino, în cadrul laboratorului de microbiologie astfel:

Pe baza datelor din literatură, am ales concentrația de 1×10^8 UFC/ml

Transportul la unitatea de experimentare s-a făcut în PBS steril, într-un termos pentru a menține temperatura în jur de 4°C și numărul de CFU numărate stabil.

Cantitatea inoculată pe fiecare implant a fost de 0.5 ml

Procesul de preparare a inoculului bacterian:

- Cu două zile înainte de inducerea chirurgicală a infecției – am dezghețat AA pe agar cu sânge și am incubat placa la 37°C , 5% CO_2 . Creșterea AA este relativ lentă și, în acest fel, am distins clar coloniile bacteriene.
- În ziua operației am preparat un inocul de 1×10^8 în PBS steril/soluție salină sterilă.
- Am verificat și confirmat numărul de CFU injectate prin numărarea plăcilor de agar.
- Inoculul a fost împărțit în diferite alicote într-un număr de Eppendorf corespunzător numărului de implanturi.
- Am pus tuburile Eppendorf cu suspensia AA la frigider la 4°C până la transport.
- Transportul efectuat cu mașină frigorifică, iar tuburile păstrate până la inoculare la frigider.

Sub anestezie generală, la primele trei animale, la care toate cele patru cadrane au primit implanturi, AA a fost inoculată într-un cadran superior și unul inferior, în timp ce celelalte două cadrane (unul superior și unul inferior) vor servi drept martori negativi. La restul de 7 animale, la care implanturile au fost plasate doar în maxilarul inferior, ligaturi și benzi de cauciuc ortodontice au fost plasate în jurul implanturilor doar pe o singură parte, în timp ce partea contralaterală va servi drept control negativ. În scopul inducerii infecției, în jurul

bonturilor de vindecare a implanturilor au fost plasate ligaturi și peste ele benzi de cauciuc ortodontice mici și o suspensie de tulpini bacteriene perio-patogene, AA, 0.5 ml/implant.

La examenul CT s-a constatat doar un singur implant căzut, restul fiind toate.

Inocularea cu AA s-a făcut săptămânal, analizându-se starea implanturilor, adenopatii, s-a măsurat resorbția osoasă.

De la săptămână la săptămână am constatat instalarea infecției, ganglioni măriți, implanturi căzute, chiar dacă starea generală a animalelor era bună. După 3 săptămâni, de acord cu colegii noștri din Israel, am decis oprirea inoculării AA și doar am împins ligaturile mai spre os. Apoi am decis efectuarea încă a unei analize de tomografie și recoltarea de probe pentru examenul bacteriologic.

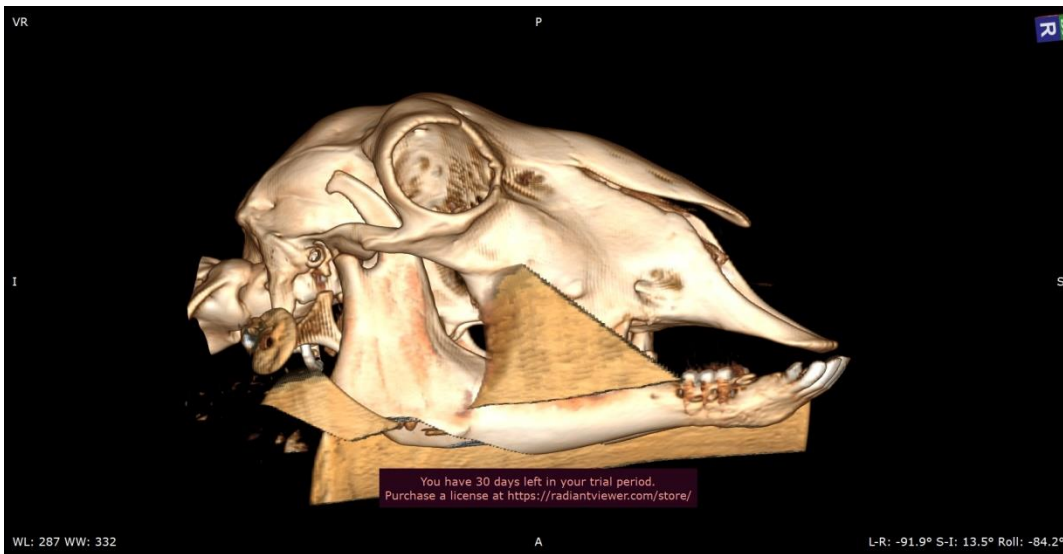
Examenul CT a evidențiat distrucții osoase masive, ceea ce a determinat pe partenerii noștri să stabilească o dată la care vor veni să recolteze probele de mandibulă/maxilla și să le ducă în Israel pentru analiza lor.

Câteva imagini fotografice și CT arată evoluția distrucțiilor și instalarea osteomielitei și periimplantitei.





Înainte de implantare



Înainte de inoculare



25.11.2021

La ultima evaluare a cavității bucale s-au recoltat fire de ligatură și inele de cauciuc pentru evaluare microbiologică. Aceasta s-a efectuat după tehnica descrisă mai departe și a identificat bacteria inoculată.

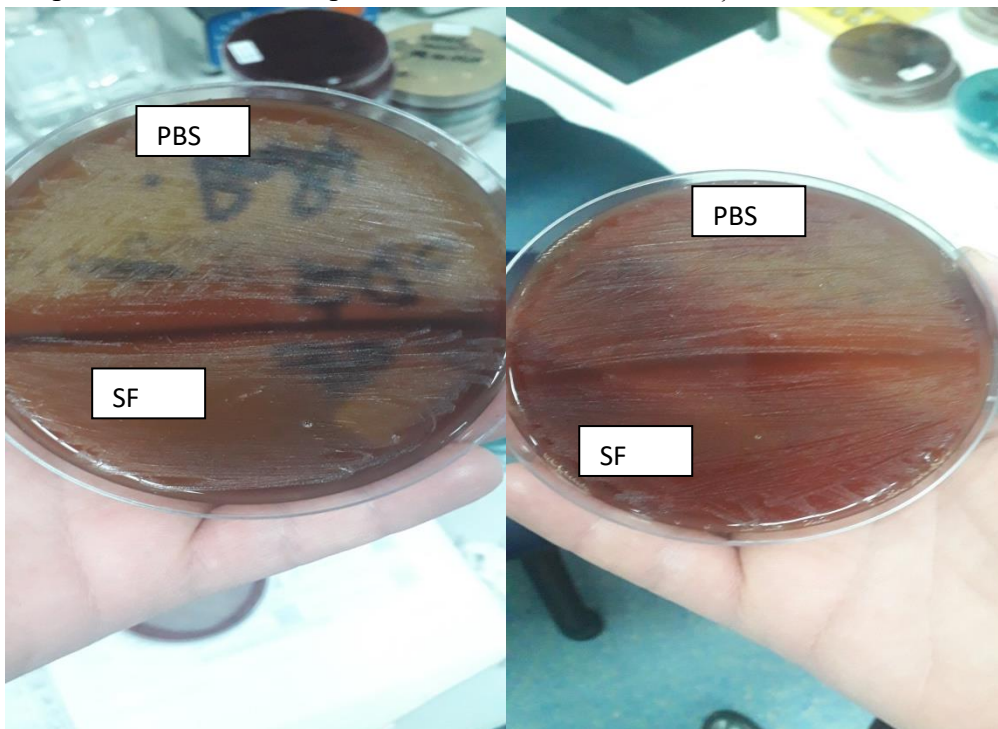
1. Tulpina de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a) ATCC 29522 a fost menținută prin congelare la -80°C în bulion Schaedler cu 30% glicerol și pe tuburi cu criobile.
2. Tulpina A.a. a fost reconstituită din stocul congelat prin însămânțare pe agar Schaedler (OXOID) cu 5% sange de berbec și agar BHI (OXOID) și incubată la 37°C în incubator cu 5% CO_2 .



A.a cultura pe agar Schaedler cu sange

A.a cultura pe agar BHI

3. Tulpina a fost confirmată prin identificare prin spectrometrie de masă MALDI TOF.
4. Din tulpina de A.a s-au preparat suspensii de 0,5 Mc Farland în două tamponare diferite ser fiziologic(SF) și Tampon Fosfat Salin (PBS), soluție 1X. Tamponul a fost obținut din PBS 10X (Sigma, Phosphate buffered saline 10X, cod P5493)
5. A fost verificată stabilitatea suspensiei în cele două soluții, timp de 2 ore, la temperatura camerei. După 2 ore nu se constată diferențe semnificative



A.a. suspensie 0.5McFarland
PBS vs. SF

A.a. suspensie 0.5McFarland
PBS vs. SF după 2 ore

6. A fost verificată stabilitatea suspensiei bacteriene de A.a. timp de 24 ore, prin menținerea firului pentru implant în suspensie timp de 24 de ore și plasarea firului pe mediul agar Schaedler cu 7% sânge. Se constată că suspensia în SF și-a pierdut viabilitatea la 24 de ore, în timp ce tulpina de A.a în PBS 1x și-a păstrat viabilitatea timp de 24 ore.



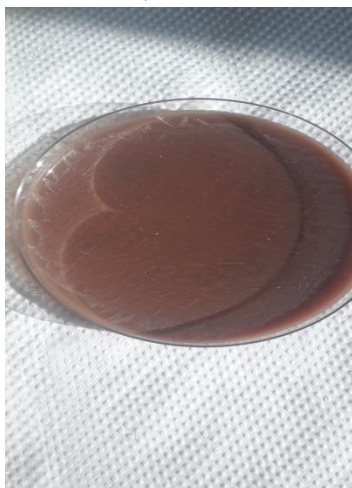
Verificarea suspensiei A.a



Verificarea suspensiei A.a 0,5 McF, PBS 1X, dupa 24h

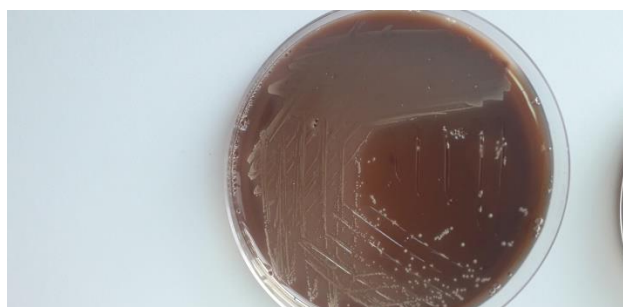
0,5 McF, S.F, dupa 24h

7. Suspensiile bacteriene 0,5 McF pentru experimente s-au realizat in PBS 1X si verificate prin insamnatore pe agar Schaedler, in momentul trimiterii suspensiei bacteriene(alicotata in tuburi Eppendorf sterile, 1,5 ml, 750 μ l/tub, 25 tuburi)

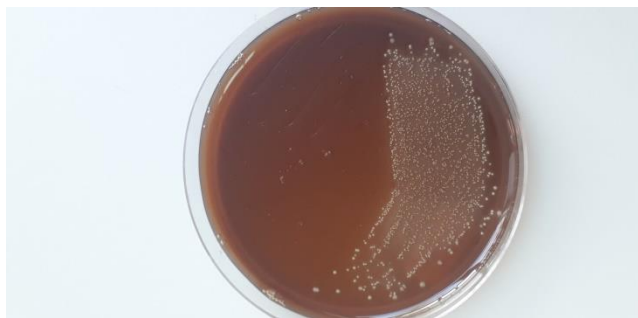


Suspensie 0,5McF, incubata 72 de ore

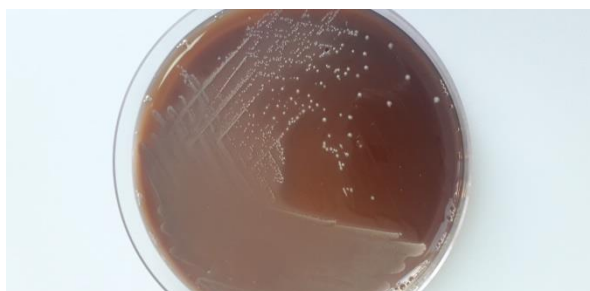
8. Firele excizate din 3 implanturi (dupa 4 saptamani), s-au plasat in bulion Schaedler, tansportate si insamnatate pe agar Schaedler cu 7% sange berbec, incubate la 37°C cu 5% CO₂ si in anaerobioza. La 24 de ore, incubate la 37°C cu 5% CO₂, s-au dezvoltat colonii usor pigmentate in galben(alb-galbui), cultura abundenta, colonii cu morfotipuri mari si mici.



Proba 1 – cultura 24h obtinuta din implant 1



Proba 2 – cultura de 24h obtinuta din implant 2



Proba 3 – cultura de 24h obtinuta din implant 3

La 48 h, cultura obtinuta din cele 3 implanturi prezinta un aspect relativ omogen, alcatuita din colonii galben- citrin, morfotipuri mari si mici, care s-au identificat prin spectrometrie de masa(MLADI TOF)

Toate tipurile de colonii au fost identificate ca *Aa*

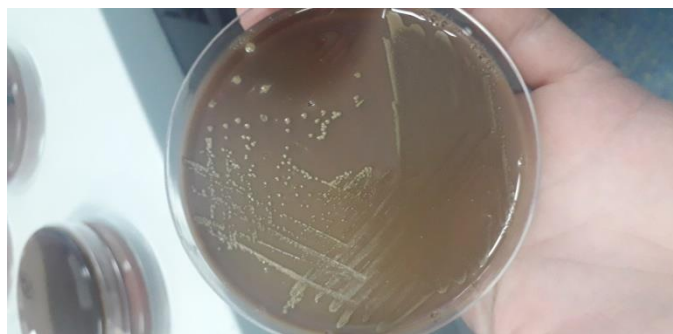


Proba 1 – cultura de 4 zile obtinuta din implant 1

Lângă coloniile de contaminare, se observa la proba 1, colonii mici gri albicioase, care s-au dezvoltat tardiv, care urmeaza a fi identificate.



Proba 2 – cultura de 4 zile obtinuta din implant 2



Proba 3 – cultura de 4 zile obtinuta din implant 3

Pe baza evoluției clinice și a analizelor imagistice și microbiologice, apreciem că osteomieliță și periimplantita a fost instalată. Pentru a analiza însă eficiența fiecărui tip de implant este necesară eutanasierea animalelor, recoltarea probelor și analizarea lor la microtomograf și histologic.

Concluzii

Rezultatele preliminare ale studiului de prevenire ale osteomielitei acute și de tratare a osteomielitei cronice arată eficiența tratamentului nanofuncționalizat cu antibiotice.

Rezultatele preliminare trebuie însă confirmate de rezultatele de microtomografie și histologie.

În studiul pe ovine s-a reușit instalarea osteomielitei și a periodontitei, însă evaluarea tratamentului se va face tot prin analizele complexe microtomografie și histologie.

Bibliografie

- Bottagisio, M., Soggiu, A., Lovati, A. B., Toscano, M., Piras, C., Romanò, C. L., Bonizzi L., Roncada P., Drago, L. (2017). Draft genome sequence of *Staphylococcus epidermidis* clinical strain GOI1153754-03-14 isolated from an infected knee prosthesis.
- Genome Announcements, 5(20). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00378-17>.
- OECD - ISO 10993-2, Biological evaluation of medical devices Part 2: Animal welfare requirements, 2016.
- LEGEA nr. 43 din 11 aprilie 2014 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice, actualizată, 2019.
- Coman C, Surdu-Bob C, Turcu D, Vlase E, Oporanu M, Badulescu M. Evaluarea clinică și microbiologică a unui model de osteomieliță umană. Rev. Rom. Med. Vet. 2013; 2: 65-72.
- Bottagisio M, Coman C, Lovati AB. Animal models of orthopaedic infections. A review of rabbit models used to induce long bone bacterial infections. J Med Microbiol. 2019;68(4):506-537.
- Ramasamy M, Lee J. Recent Nanotechnology Approaches for Prevention and Treatment of Biofilm- Associated Infections on Medical Devices Recent Nanotechnology Approaches for Prevention and Treatment of Biofilm-Associated Infections on Medical Devices. Biomed Res. Int. (2016:1851242.) (2016).

- Shah SR, Tataru AM, D'Souza RN, Mikos AG, Kasper FK. Evolving strategies for preventing biofilm on implantable materials. *Mater. Today*. 16(5), 177–182 (2013).
- Lovati AB, Bottagisio M, Vecchi E De, Gallazzi E, Drago L. Animal models of implant-related low-grade infections. A twenty-year review. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. (2017).
- Lovati AB, Romanò CL, Bottagisio M, et al. Modeling staphylococcus epidermidis-induced non-unions: Subclinical and clinical evidence in rats. *PLoS One*. 11(1) (2016).
- Lovati AB, Drago L, Bottagisio M, et al. Systemic and Local Administration of Antimicrobial and Cell Therapies to Prevent Methicillin-Resistant Staphylococcus epidermidis -Induced Femoral Nonunions in a Rat Model. *Mediators Inflamm*. 2016 (2016).
- Surdu-Bob CC, Coman C, Barbuceanu F, Turcu D, Bercaru N, Badulescu M. The influence of foreign body surface area on the outcome of chronic osteomyelitis. *Med. Eng. Phys.* 38(9), 870–876 (2016).
- Lovati AB, Romanò CL, Bottagisio M, et al. Modeling staphylococcus epidermidis-induced non-unions: Subclinical and clinical evidence in rats. *PLoS One*. 11(1) (2016).
- David Reinedahl, Silvia Galli, Tomas Albrektsson, Pentti Tengvall, Carina B. Johansson, Petra Hammarström Johansson, Ann Wennerberg. Aseptic Ligatures Induce Marginal Peri-Implant Bone Loss—An 8-Week Trial in Rabbits. *J. Clin. Med*. 2019, 8, 1248; doi:10.3390/jcm8081248.
- Tao H , Cong C, Zhiguo X, Gen L, Huiliang C, Xuanyong L, Chao Zhang, Yuqi Dong - A comparison of micro-CT and histomorphometry for evaluation of osseointegration of PEO-coated titanium implants in a rat model, *Nature Scientific Reports*, 7: 16270 , DOI:10.1038/s41598-017-16465-4
- Gehrke SG , Tiago Luis Eliers Treichel TLE, Letícia Pérez-Díaz L, Calvo-Guirado JL, Aramburú Júnior J , Patricia Mazón P, Piedad de Aza N - Impact of Different Titanium Implant Thread Designs on Bone Healing: A Biomechanical and Histometric - Study with an Animal Model *J. Clin. Med*. 2019, 8, 777; doi:10.3390/jcm8060777
- Freire MO, Sedghizadeh PP, Schaudinn C, Gorur A, Downey JS, Choi JH, Chen W, Kook JK, Chen C, Goodman SD, Zadeh HH. Development of an animal model for *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilm-mediated oral osteolytic infection: a preliminary study. *J Periodontol*. 2011 May;82(5):778-89. doi: 10.1902/jop.2010.100263. Epub 2011 Jan 11. PMID: 21222546; PMCID: PMC3496747.
- Liu J, Schmidlin P, Philipp A, Hild N, Tawse-Smith A, Duncan W. Novel bone substitute material in alveolar bone healing following tooth extraction: an experimental study in sheep. *Clin. Oral Impl. Res*. 27, 2016, 762–770 doi: 10.1111/clr.12673
- Voss P, Ludwig U, Poxleitner P, Bergmaier V, El-Shafi N, von Elverfeldt D, et al. Evaluation of BP-ONJ in osteopenic and healthy sheep: comparing ZTE-MRI with mCT. *Dentomaxillofac Radiol* 2016; 45: 20150250.

SCIENTIFIC REPORT 2021

Objectives in 2021

Consortium objectives:

- Production of metal implants loaded with fibrin and fibrin + antibiotics;
- *In vitro* testing;
- Starting animal studies to test the effectiveness of preventive and curative treatment: rats at the Galeazzo Orthopedic Institute in Italy and rabbits and sheep at the Cantacuzino Institute, Bucharest.

Objectives of the National Institute for Medical-Military Development Research ,, Cantacuzino ,,:

Creation and application of treatment in the experimental model of osteomyelitis in rabbits and rams by

- Induction of the acute and chronic phase of osteomyelitis and application of treatment to rabbits

and

- Induction of osteomyelitis in rams and application of implants with treatment

Summary of the 2021 stage

The year 2020 characterized by the COVID 19 pandemic determined the postponement of the project by one year, all activities being postponed accordingly. In addition, it was necessary to change some activities, namely the abandonment of the pig animal model and the transfer to a sheep model, the reason being the too high costs of the pig model. Another change was the takeover of the activities of acquisition, care, etc. of sheep by the Cantacuzino Institute, and the final analyzes (microtomography, resin embedding histopathology and histomorphometry) will be performed at Tel Aviv University, Israel. In exchange for these services, Tel Aviv University also took over the rabbit shins for the same final analysis. The final results will be available in 2022.

Under these conditions, the Cantacuzino Institute performed the experiments entirely on rabbits, creating a model for the prevention of acute osteomyelitis by applying treatment with the bacterium and induced chronic osteomyelitis and then applying the treatment with fibrin-laden implants, nanoparticles and antibiotics.

Also, the sheep were purchased and the experimental model of implantation and induction of osteomyelitis and peri-implantitis was created, the study being still in progress.

Scientific and technical description

Ethical statement

Animal studies have been approved favorably since 2019 by the ethics commission of INCDMM Cantacuzino (CI), favorable opinion no. 351 / 13.08.2019 and authorized by the competent authority, project authorization no. 471 / 02.10.2019. In 2021 we prepared and submitted the file for the authorization of studies on sheep, the experiments were approved favorably by the ethics commission of INCDMM Cantacuzino (CI), report no. 43 /

13.04.2021 and authorized by the competent authority, project authorization no. 625 / 17.05.2021. All experiments were performed in accordance with the rules for the care and use of animals used for scientific purposes established by national and European regulations and the application of the 3R principles. The studies were performed in INCDMM Cantacuzino, Băneasa Resort, Preclinical Testing Unit (SB), a unit authorized as a user unit by the competent authority.

Evaluation of innovative nanoparticle treatment in the prevention of acute osteomyelitis induced by MRSE in rabbits

The aim of this study was to evaluate innovative nanoparticle treatment in the prevention of MRSE-induced acute osteomyelitis in rabbits.

The Staphylococcus Epidermidis Methicillin Resistant - MRSE strain isolated from an infected knee prosthesis at a concentration of 6×10^8 CFU / ml was used for this experiment. The bacterium in the established concentration was prepared on the day of inoculation in Băneasa Resort, thus avoiding transport.

The innovative treatment was loaded in dental implants of the following types:

- Void implants- M
- Nanofunctionalized implants with PSF / NCSR # 9 (control group) - C
- Nanofunctionalized implants with PSF/NCSR # 11HL (vancomycin treatment group) - T

54 adult rabbits were selected, New Zealand males and females, body weight over 2500 gr. at the beginning of the study. The animals were individualized and marked. The animals were divided into 3 lots as follows:

Groups	Animals on groups	Procedures performed
M	18	Creation of bone defect in the trabecular area and insertion of an empty implant immersed in MRSE (5 hours), conc 6×10^8 CFU / ml. Observation the animals for 14 days.
C	18	Creation of bone defect in the trabecular area and introduction of nanofunctionalized implants with PSF / NCSR # 9 immersed in MRSE (5 hours), conc 6×10^8 CFU / ml. Observationthe animals for 14 days.
T	18	Creation of bone defect in the trabecular area and introduction of nanofunctionalized implants with PSF / NCSR # 11HL immersed in MRSE (5 hours), conc 6×10^8 CFU / ml. Observation the animals for 14 days.

Implantation technique:

On the anesthetized rabbits, it was made in the tibia of the left foot of each animal, in the proximal trabecular area, a cavity at the level of the tibia, progressively, using a drill of 1mm, 1.5mm, 2mm, 2.5 mm, 3mm, 3 , 5mm and 4mm. The whole process of creating the cavity was carried out under cooling with pure water, in a continuous jet. In the bone defect, the

implant was placed and the bacterium was inoculated next to it. A bone-dental adhesive was applied over the bone defects. The operation was closed by practicing the suture in 2-3 separate stitches using non-absorbable thread. A protective layer of Aluminum, sterile compresses and a Pet-Flex bandage were applied over the closed wound. Immediately postoperatively for 3 days, all rabbits were treated with analgesics.

The study lasted 14 days, after which the animals were euthanized and the tibia were harvested.

The animals were monitored daily for their general health by observation following:

- general condition,
- lethargy,
- unappetizing,
- limping.

Local signs were monitored daily at the site of inoculation and then weekly, following:

- erythema
- moderate, large soft swellings
- pus or exudation of pus
- The animals were weighed at Z0, Z7, Z14
- Blood was collected preoperatively and postoperatively at Z1, Z3, to perform the hematological examination and to obtain serum for the immunological examination.
- Immunological examinations:
 - C-reactive protein
 - Interleukins
- Necropsy: in animals killed during the experiment, euthanized during the study and at the established dates. The following were followed:
 - soft tissue and intramedullary / trabecular cavity evaluated for pus,
 - abscess formation,
 - sinus drainage,
 - cortical lysis,
 - mal-union and non-union.

The tibia was sent for processing to the microbiology laboratory. The aim is:

- Identification of bacteria,
- Count CFU.
- Examination of microcomputer tomography and subsequent histological processing by inclusion in the resin. Data analysis.

Results

Survival rate: In this experiment, a survival rate of 100% was recorded in all groups.

The analysis of the clinical signs made by observation and found during the experiment did not show any clinical signs at the level of the operations.

The evolution of body weight was weight gain, at a faster rate in the treatment group.

Body temperature was measured using a digital thermometer, and the results show no statistically significant changes.

Haematological tests were performed on an Idexx Procyte 5 Diff device, from blood collected on EDTA. Between the 3 groups the results did not show statistically significant differences

The microbiological examination was performed on the samples were received and were worked in the hood, with sterile instruments. However, certain instruments (the bone cutter) could not be sterilized from sample to sample and were only decontaminated with alcohol. The implant was first identified.

At first, attempts were made to obtain samples from several areas in and around the implant: peri-implant, hematogenous marrow, distal head of the tibia.

But, consistently, the best results were obtained by entering the "thread" area (thinner) of the loop on the channel (approximately taken volume - 0.5 - 1 uL).

After the wire loop was explored and a piece of bone was isolated from the implant, it was placed in 10 mL of sterile saline. It was vortexed for 2 minutes, then sonicated (ultrasonic bath) for 5 minutes, followed by a new 2-minute vortex. From the supernatant, 100 uL was sown in culture medium and the colonies were counted.

All strains evaluated were identified by MALDI-TOF-MS as *S. epidermidis* and showed the antibody "MRSE" with specific resistance to fluoroquinolones, aminoglycosides, trimethoprim, bisseptol.

The results are highlighted in the table below

Group	Thread 1	Thread 2	Sonicat 1	Sonicat 2	Sonicat 3	Median
C 32	378	291	61	26	54	54
C 33	340	208	67	60	71	67
C 22	98	103	37	41	39	39
C 24	353	27	32	19	27	27
M4	0	0	0	0	0	0
M5	0	0	0	0	0	0
M6	0	0	6	8	5	6
T 39	0	0	0	0	0	0
T 40	0	0	3	0	0	0
T 41	0	0	0	0	0	0
T 42	0	0	0	0	0	0

The results show the identification of MRSE in groups C and M (in smaller quantities and only in a rabbit), but not in the group that received treatment.

3 photos of MRSE colonies are shown below.

Group C



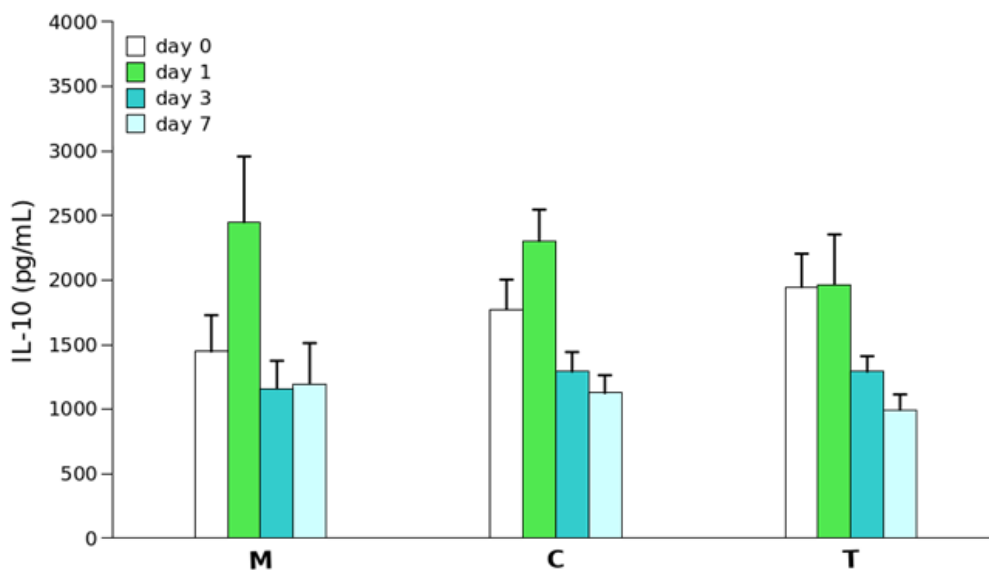
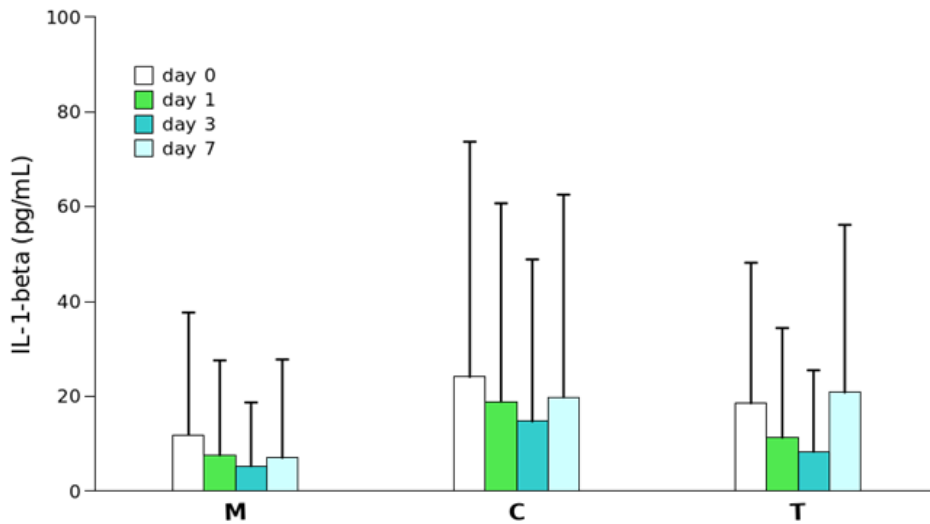
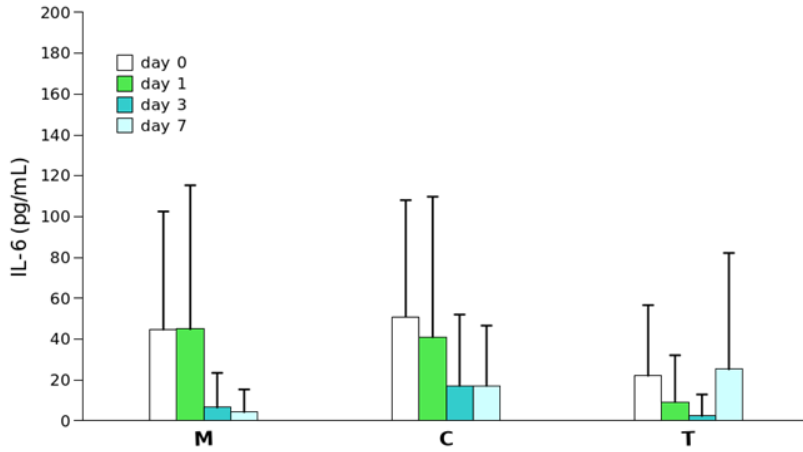
Group M

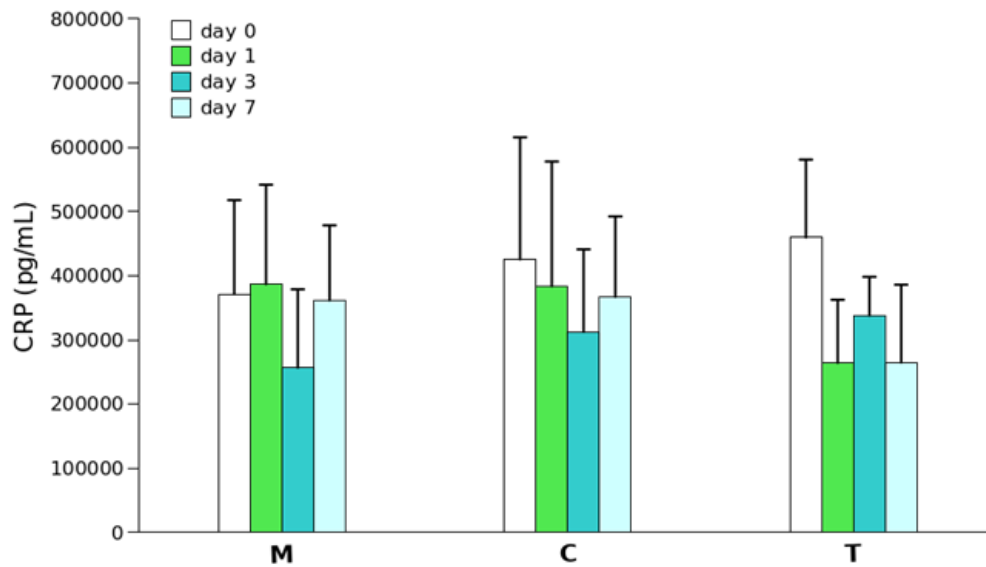


Group T



Evaluation of cytokines showed that immunoglobulins decreased after day 0, a decrease caused by the inoculation of anti-inflammatory drugs, after which the highest value was at day 1, which subsequently decreased. The most accurate analysis, respectively the C-reactive protein, shows a favorable evolution of the infection in group T and statistically significant differences compared to the other groups, as can be seen in the graphs below.





Based on the results so far, especially the immunological and microbiological ones, we can say that the treatment prevents the onset of osteomyelitis, but it remains for the results to be confirmed by other tests, namely microtomography, histopathology and histomorphometry.

Evaluation of innovative nanoparticle treatment in the treatment of MRSE-induced chronic osteomyelitis in rabbits

The aim of this study was to evaluate innovative nanoparticle treatment in the treatment of MRSE-induced chronic osteomyelitis in rabbits.

Staphylococcus Epidermidis Methicillin Resistant - MRSE strain isolated from an infected knee prosthesis at a concentration of 6×10^8 CFU / ml was used for this experiment. The bacterium in the established concentration was prepared on the day of inoculation in Băneasa Station, thus avoiding transport.

The innovative treatment was loaded in dental implants of the following types:

- Void implants - M
- Nanofunctionalized implants with PSF / NCSR # 9 (control group) - C
- Nanofunctionalized implants with PSF / NCSR # 11HL (vancomycin treatment group) - T

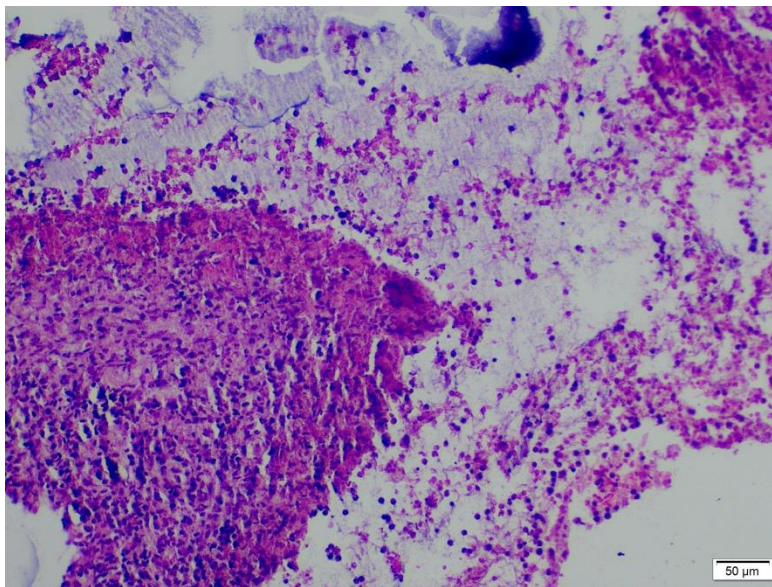
54 adult rabbits were selected, New Zealand males and females, body weight over 2500 gr. at the beginning of the study. The animals were individualized and marked.

This study had 2 stages:

- Induction of osteomyelitis
- Implant application

The induction of osteomyelitis was done as in the other studies, respectively by creating the bone defect and applying cotton meshes previously soaked in the MRSE solution.

The animals were monitored clinically, and after 3 weeks, we euthanized 3 rabbits to confirm the onset of osteomyelitis. Histopathological microbiological evaluation confirmed the onset of chronic osteomyelitis, as can be seen in the figure below.



Tibia with chronic osteomyelitis

Then we moved on to the second stage. The operation was completely opened on the anesthetized animals, the cotton mesh was removed and the implant was applied.

The animals were divided into 3 groups, randomized as follows:

Group	Animals on group	Procedures performed
M	17	Creation of a bone defect in the trabecular area and insertion of an void implant
C	17	Creation of the bone defect in the trabecular area and introduction of nanofunctionalized implants with PSF / NCSR # 9
T	17	Creation of the bone defect in the trabecular area and introduction of nanofunctionalized implants with PSF / NCSR # 11HL

The animals were monitored for 5 weeks, this being considered the minimum osseointegration time according to the previous studies.

At the end of the study, the animals were euthanized and the tibia was harvested for microcomputer examination, tomography and subsequent histological processing by inclusion in the resin.

Results

Survival rate: In this experiment, a survival rate of 100% in group T, 90% in group C and M was recorded.

The analysis of the clinical signs made by observation revealed clinical signs at the level of operations in a percentage of 5% of the rabbits in which MRSE was inoculated. Clinical signs manifested mainly locally by abscesses.

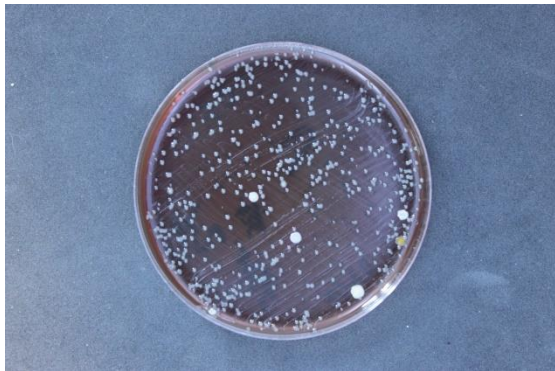
The evolution of body weight has been to maintain weight.

Hematological analyzes did not show statistically significant differences between groups.

The microbiological analyzes were performed according to the same protocol as in acute study, and the results are highlighted below.

ID	thread 1	thread 2	Sonicat 1	Sonicat 2	Sonicat 3
72 M	62	84	600	600	700
73 M	56	76	700	550	600
74 M	52	89	500	550	450
80 C	12	18	350	250	300
81 C	34	45	300	300	250
82 C	33	27	400	450	300
102 T	0	0	0	0	0
103 T	0	0	0	0	0
104 T	0	0	0	0	0

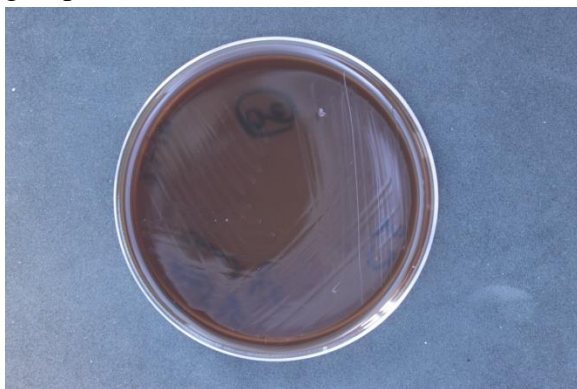
group C



group M



group T



The results of the experiments on rabbits, acute prevention and chronic treatment, showed in terms of microbiological analyzes related to clinical ones that the groups to which the nanofunctionalized antibiotic treatment was applied have positive results compared to the other groups.

It remains for the most sensitive analyzes, microCT and histopathology to confirm these premises.

Evaluation of nanofunctionalized antibiotic treatment in osteomyelitis and sheep-induced periimplantitis.

Sheep, Țigaie breed, 4.5-5 years old, completely closed mouth, perfect healthy were used for this study. The sheep were purchased from a specialist farm in Hungary. The use of rams has been abandoned because their horns prevent surgery.

After 30 days of quarantine and accommodation, the first 2 premolars were extracted from all 4 quadrants of the mouth. Prior to extraction, all animals were fed both food and water for 12 hours and given a dose of antibiotic (Enrofloxacin).

Anesthesia: premedication with Dexmedetomidine and Ketamine IM. After 30 minutes Propofol IV was administered, then the animal was intubated and the anesthesia was maintained with 3% isoflurane.

Surgical technique: the animal was placed in lateral decubitus and from each semidentar arch (up-down, left-right) the first two premolars were extracted. The first phase consisted of dislocating each tooth with the help of a dislocator and then extracting it with pliers. In some situations, when inserting the elevator between premolars was difficult due to the small interdental space, then I used a conical cutter to create interdental grooves used as a lifting lever. A hemostatic sponge was inserted into the remaining alveolus and where the cavity was very large, the gum was sutured with resorbable 3/0 thread.

The animals, after extraction, were infused with 0.9% saline and received anti-inflammatory treatment (Meloxicam 0.5 mg / kg) for 3 days and antibiotic (Enrofloxacin 2.5 mg / kg) for 5 days. The healing time after extraction was 3 months.

Some pictures from the extraction operation are inserted below





After a healing period of 3 months, the implants were implanted, an operation performed by 3 specialists from Tel Aviv University, Israel. But before that, a CT scan was done.

Although initially, the protocol stabilized to implant in each quadrant one type of implant (1) void MI; 2) MI + PSF; 3) MI + ANF-PSF) was successfully implanted in 4 quadrants only in 3 sheep. Due to anatomical and technical reasons, such as extremely thick soft tissue, bone type, low bone availability, perforation of the nasal cavities and sinuses with extreme implants, extreme difficulty in placing implants in the upper part. jaw, it was decided, together with the team of veterinarians of the Cantacuzino Institute, to place the implants on the remaining 7 animals only in the lower jaw. Consequently, only 6 implants were placed in each of the seven remaining animals, 3 on each semi-mandible.

At this point, we would like to mention that the connection between the implants and the Silk Fibroin matrices was extremely weak, already at the time of taking the implant from the sterilization bag, without any contact with any instrument, the coating was partially detached from the implant. Obviously, a similar event could be appreciated at the time of implant placement, where the coating particles could be seen on the surface of the bone. We cannot assess the number of implants in which this was evident or the amount of silk fibroin matrix that remained effectively on the implant surfaces after their complete insertion into the bone. Immediately after the implant was inserted, smooth healing abutments and resorbable sutured area were placed on all implants.

Healing was without major events, and the animals continued in their normal regime.

Below are some photos from the implant





About 5 weeks after the implant was inserted, I began to induce peri-implant infection. Before starting the inoculation, I did a new CT scan to see the healing stage of the implant area.

The bacterium chosen was *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (AA) is a Gram-negative, facultative, immobile anaerobic bacterium that is often found in association with localized aggressive periodontitis, a severe periodontitis infection.

The preparation of the bacterium in the inoculate solution was done at the headquarters of the Cantacuzino Institute, within the microbiology laboratory as follows:

Based on the data from the literature, we chose the concentration of 1×10^8 CFU / ml.

Transport to the experimental unit was done in sterile PBS, in a thermos to keep the temperature around 4°C and the number of CFUs counted stably.

The amount inoculated per implant was 0.5 ml.

The process of preparing the bacterial inoculum:

- Two days before surgical induction of the infection - I thawed AA on blood agar and incubated the plate at 37°C , 5% CO_2 . The growth of AA is relatively slow and thus clearly distinguishes bacterial colonies.
- On the day of the operation I prepared a 1×10^8 inoculum in sterile PBS / sterile saline.
- We checked and confirmed the number of CFUs injected by counting the agar plates.
- The inoculum was divided into different aliquots into an Eppendorf number corresponding to the number of implants.
- I put the Eppendorf tubes with the AA suspension in the fridge at 4°C until transport.
- Transport by refrigerator and tubes kept until inoculated in the refrigerator.

Under general anesthesia, in the first three animals, in which all four quadrants received implants, AA was inoculated into one upper and one lower quadrant, while the other two quadrants (one upper and one lower) will serve as negative controls. In the remaining 7

animals, in which the implants were placed only in the lower jaw, orthodontic ligatures and rubber bands were placed around the implants on only one side, while the contralateral part will serve as a negative control. In order to induce the infection, small orthodontic rubber bands and a suspension of peri-pathogenic bacterial strains, AA, 0.5 ml / implant were placed around the implant healing abutments and over them.

The CT scan showed only one fallen implant, the rest being all.

Inoculation with AA was done weekly, analyzing the condition of the implants, lymphadenopathy, bone resorption was measured.

From week to week I noticed the installation of the infection, enlarged lymph nodes, fallen implants, even if the general condition of the animals was good. After 3 weeks, in agreement with our colleagues in Israel, we decided to stop AA inoculation and just pushed the ligaments closer to the bone. Then I decided to do another CT scan and take samples for bacteriological examination.

The CT scan showed massive bone damage, which led our partners to set a date for them to come and collect the jaw samples and take them to Israel for analysis.

Some photographic and CT images show the evolution of the destruction and the installation of osteomyelitis and periimplantitis.





Before implantation



Before inoculation



6 weeks after first inoculation

At the last evaluation of the oral cavity, ligature threads and rubber rings were collected for microbiological evaluation. This was done according to the technique described below and identified the inoculated bacteria.

1. The strain of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.A) ATCC 29522 was maintained by freezing at -80°C in Schaedler broth with 30% glycerol and in tubes with crayfish.

2. Strain A.A. was reconstituted from frozen stock by seeding on Schaedler agar (OXOID) with 5% ram's blood and BHI agar (OXOID) and incubated at 37°C in an incubator with 5% CO_2 .



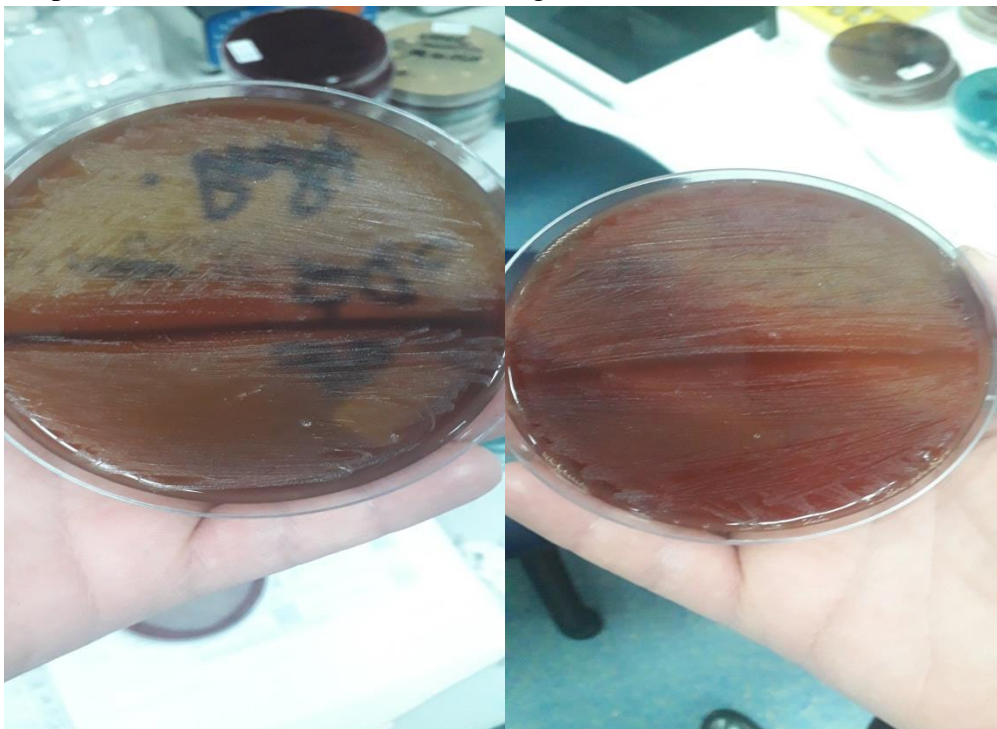
A.A culture on Schaedler agar with blood

A.A culture on agar BHI

3. The strain was confirmed by MALDI TOF mass spectrometry identification.

4. Suspensions of 0.5 McFarland in two different saline buffers (SF) and Saline Phosphate Buffer (PBS), 1X solution were prepared from the A.A strain. The buffer was obtained from PBS 10X (Sigma, Phosphate buffered saline 10X, code P5493)

5. The stability of the suspension in the two solutions was checked for 2 hours at room temperature. After 2 hours there are no significant differences.



A.A. suspension 0.5McFarland

A.a. suspension 0.5McFarland

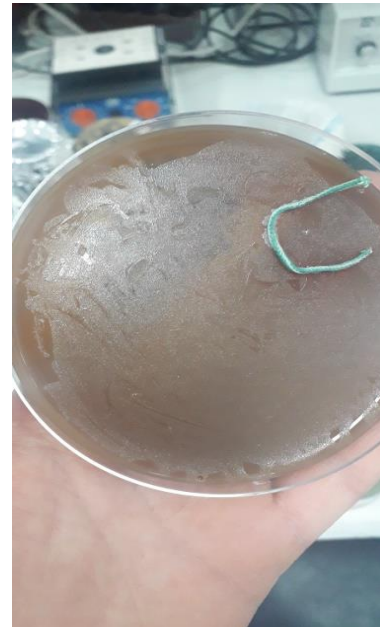
PBS vs. SF

PBS vs. SF after 2 hours

6. The stability of the bacterial suspension of A.A. for 24 hours, by keeping the implant wire in suspension for 24 hours and placing the wire on the Schaedler agar medium with 7% blood. It is found that the SF suspension lost its viability at 24 hours, while the A.A strain in PBS 1x maintained its viability for 24 hours.

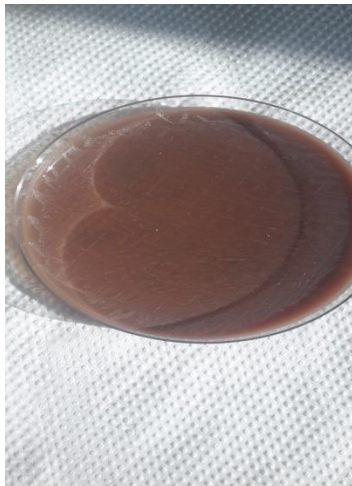


AA suspension 0,5 McF, S.F, after 24h



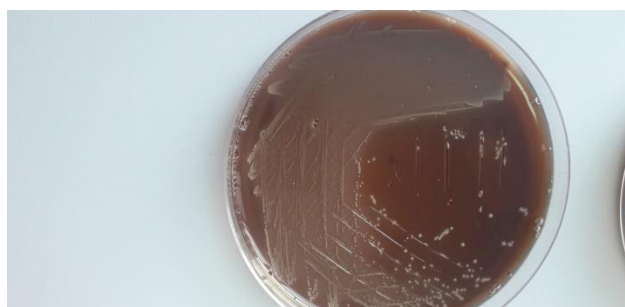
A.A suspension 0,5 McF, PBS 1X,

7. Bacterial suspensions 0.5 McF for experiments were made in 1X PBS and verified by seeding on Schaedler agar, at the time of sending the bacterial suspension (aliquoted in sterile Eppendorf tubes, 1.5 ml, 750 μ l / tube, 25 tubes)

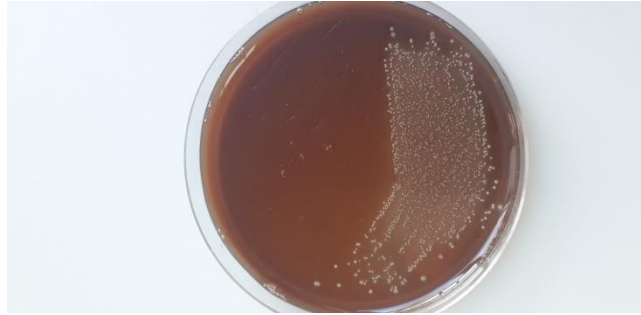


AA suspension 0,5McF, incubated 72 hours

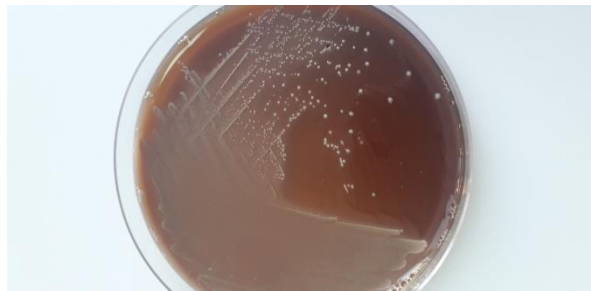
8. The excised wires from 3 implants (after 4 weeks) were placed in Schaedler broth, transported and seeded on Schaedler agar with 7% ram blood, incubated at 37 ° C with 5% CO₂ and in anaerobiosis. At 24 hours, incubated at 37 ° C with 5% CO₂, slightly pigmented yellow (white-yellow) colonies developed, abundant culture, colonies with large and small morphotypes.



Sample 1 – 24h culture obtained from implant 1



Sample 2 – 24h culture obtained from implant 2



Sample 3 – 24h culture obtained from implant 3

At 48 h, the culture obtained from the 3 implants has a relatively homogeneous appearance, consisting of yellow-citrine colonies, large and small morphotypes, which were identified by mass spectrometry (MLADI TOF)

All types of colonies have been identified as AA.

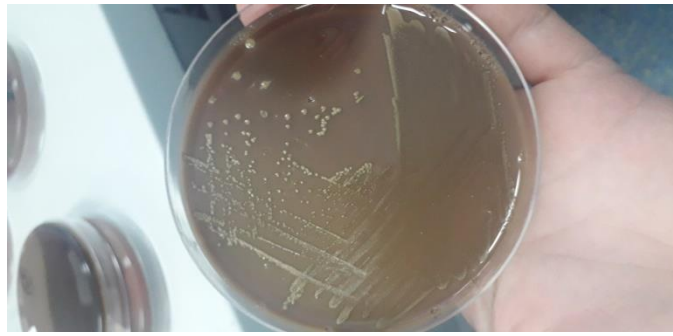


Sample 1 – 4 days culture obtained from implant 1

In addition to contamination colonies, sample 1 shows small whitish-gray colonies, that have developed late, to be identified.



Sample 2 – 4 days culture obtained from implant 2



Sample 3 – 4 days culture obtained from implant 3

Based on the clinical evolution and the imaging and microbiological analyzes, we appreciate that osteomyelitis and periimplantitis were installed. However, in order to analyze the efficiency of each type of implant, it is necessary to euthanize the animals, collect samples and analyze them with a microtomograph and histology.

Conclusions

- Preliminary results of the study of prevention of acute osteomyelitis and treatment of chronic osteomyelitis show the effectiveness of nanofunctionalized antibiotic treatment.
- However, the preliminary results must be confirmed by microtomography and histology results.
- In the study on sheep, the reproduction of osteomyelitis and periodontitis was successful, but the evaluation of the treatment will also be done through complex microtomography and histology analyzes.

References

- Bottagisio, M., Soggiu, A., Lovati, A. B., Toscano, M., Piras, C., Romanò, C. L., Bonizzi L., Roncada P., Drago, L. (2017). Draft genome sequence of *Staphylococcus epidermidis* clinical strain GOI1153754-03-14 isolated from an infected knee prosthesis. *Genome Announcements*, 5(20). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00378-17>.
- OECD - ISO 10993-2, Biological evaluation of medical devices Part 2: Animal welfare requirements, 2016.
- LEGEA nr. 43 din 11 aprilie 2014 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice, actualizată, 2019.
- Coman C, Surdu-Bob C, Turcu D, Vlase E, Oporanu M, Badulescu M. Evaluarea clinică și microbiologică a unui model de osteomieliță umană. *Rev. Rom. Med. Vet.* 2013; 2: 65-72.
- Bottagisio M, Coman C, Lovati AB. Animal models of orthopaedic infections. A review of rabbit models used to induce long bone bacterial infections. *J Med Microbiol.* 2019;68(4):506-537.
- Ramasamy M, Lee J. Recent Nanotechnology Approaches for Prevention and Treatment of Biofilm- Associated Infections on Medical Devices Recent Nanotechnology Approaches for Prevention and Treatment of Biofilm-Associated Infections on Medical Devices. *Biomed Res. Int.* (2016:1851242.) (2016).
- Shah SR, Tatara AM, D'Souza RN, Mikos AG, Kasper FK. Evolving strategies for preventing biofilm on implantable materials. *Mater. Today.* 16(5), 177–182 (2013).

- Lovati AB, Bottagisio M, Vecchi E De, Gallazzi E, Drago L. Animal models of implant-related low-grade infections. A twenty-year review. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. (2017).
- Lovati AB, Romanò CL, Bottagisio M, et al. Modeling staphylococcus epidermidis-induced non-unions: Subclinical and clinical evidence in rats. *PLoS One*. 11(1) (2016).
- Lovati AB, Drago L, Bottagisio M, et al. Systemic and Local Administration of Antimicrobial and Cell Therapies to Prevent Methicillin-Resistant Staphylococcus epidermidis -Induced Femoral Nonunions in a Rat Model. *Mediators Inflamm*. 2016 (2016).
- Surdu-Bob CC, Coman C, Barbuceanu F, Turcu D, Berbaru N, Badulescu M. The influence of foreign body surface area on the outcome of chronic osteomyelitis. *Med. Eng. Phys.* 38(9), 870–876 (2016).
- Lovati AB, Romanò CL, Bottagisio M, et al. Modeling staphylococcus epidermidis-induced non-unions: Subclinical and clinical evidence in rats. *PLoS One*. 11(1) (2016).
- David Reinedahl, Silvia Galli, Tomas Albrektsson, Pentti Tengvall, Carina B. Johansson, Petra Hammarström Johansson, Ann Wennerberg. Aseptic Ligatures Induce Marginal Peri-Implant Bone Loss—An 8-Week Trial in Rabbits. *J. Clin. Med*. 2019, 8, 1248; doi:10.3390/jcm8081248.
- Tao H , Cong C, Zhiguo X, Gen L, Huiliang C, Xuanyong L, Chao Zhang, Yuqi Dong - A comparison of micro-CT and histomorphometry for evaluation of osseointegration of PEO-coated titanium implants in a rat model, *Nature Scientific Reports*, 7: 16270 , DOI:10.1038/s41598-017-16465-4
- Gehrke SG , Tiago Luis Eliers Treichel TLE, Letícia Pérez-Díaz L, Calvo-Guirado JL, Aramburú Júnior J , Patricia Mazón P, Piedad de Aza N - Impact of Different Titanium Implant Thread Designs on Bone Healing: A Biomechanical and Histometric - Study with an Animal Model *J. Clin. Med*. 2019, 8, 777; doi:10.3390/jcm8060777
- Freire MO, Sedghizadeh PP, Schaudinn C, Gorur A, Downey JS, Choi JH, Chen W, Kook JK, Chen C, Goodman SD, Zadeh HH. Development of an animal model for *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilm-mediated oral osteolytic infection: a preliminary study. *J Periodontol*. 2011 May;82(5):778-89. doi: 10.1902/jop.2010.100263. Epub 2011 Jan 11. PMID: 21222546; PMCID: PMC3496747.
- Liu J, Schmidlin P, Philipp A, Hild N, Tawse-Smith A, Duncan W. Novel bone substitute material in alveolar bone healing following tooth extraction: an experimental study in sheep. *Clin. Oral Impl. Res.* 27, 2016, 762–770 doi: 10.1111/clr.12673
- Voss P, Ludwig U, Poxleitner P, Bergmaier V, El-Shafi N, von Elverfeldt D, et al. Evaluation of BP-ONJ in osteopenic and healthy sheep: comparing ZTE-MRI with mCT. *Dentomaxillofac Radiol* 2016; 45: 20150250.