

Attività antimicrobica della nitrofurantoina e del Trimix contro *Enterococcus faecalis* isolato da infezioni endodontiche

L'obiettivo dello studio è stato quello di valutare la suscettibilità alla nitrofurantoina dell'Enterococcus faecalis isolato da infezioni endodontiche e di confrontare i risultati con quelli ottenuti con il Trimix (ciprofloxacina, metronidazolo e minociclina) rispetto all'azione antibatterica. La nitrofurantoina è risultata efficace contro l'E. faecalis presente nelle infezioni endodontiche e che esplica un'attività antibatterica superiore rispetto al Trimix.

■ Carolina de Figueirêdo Gaudencio Barbosa¹, MDSc
■ Cleber Keiti Nabeshima², PhD
■ José Edgar Valdivia³, DDS

¹Post Graduate (Master Degree) in Dentistry, Centro de Pós Graduação São Leopoldo Mandic, Campinas, SP, Brazil

²Post Graduate (Doctoral Degree) in Endodontics, Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

³Post Graduate Student (Master Degree) in Endodontics, Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry,

■ Silvana Cai⁴, PhD
■ Manoel Eduardo de Lima Machado⁵, PhD

University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

⁴Professor, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

⁵Associate Professor, Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

◆ Corrispondenza/Correspondence

Manoel Eduardo de Lima Machado - professormachado@hotmail.com

L'evoluzione tecnologica ha introdotto diverse procedure automatizzate che contribuiscono a semplificare e velocizzare il trattamento endodontico^{1,2}.

Tuttavia, i test hanno dimostrato che, benché gli strumenti endodontici possano ridurre significativamente il contenuto batterico, i microrganismi non vengono completamente eliminati³⁻⁶. Di conseguenza, nei casi che richiedono più di una seduta, durante la preparazione del canale radicolare è importante utilizzare sostanze chimiche, compresi farmaci intracanalari^{7,8}.

La presenza di batteri è uno dei principali fattori responsabili dello sviluppo di parodontite periapicale⁹; tra la varietà di microrganismi in grado di colonizzare il sistema del canale radicolare, l'*Enterococcus faecalis* riesce a sopravvivere in ambienti poveri di nutrienti¹⁰ ed è resistente sia al trattamento endodontico, sia ai farmaci convenzionali intracanalari¹¹⁻¹³; è quindi frequentemente osservato nei casi di parodontite apicale

Antimicrobial activity of the Nitrofurantoin and Trimix against *Enterococcus faecalis* from endodontic infections

The objective of this study was to assess the susceptibility of Enterococcus faecalis from Endodontic Infections to nitrofurantoin and to compare the results with those of Trimix (ciprofloxacin, metronidazole and minocycline) regarding their antibacterial action. Nitrofurantoin was found to be effective against E. faecalis present in endodontic infections, including a superior antibacterial activity compared to Trimix.

The technological evolution has highlighted several automated systems which contribute to make the endodontic treatment easier and faster^{1,2}.

However, assays have demonstrated that although root canal instrumentation can reduce the bacterial content significantly, microorganisms are not completely eliminated³⁻⁶. Therefore, it is important to use chemicals during the root canal preparation, including intra-canal medication, when these cases involve more than one visit^{7,8}.

The presence of bacteria is one of the main factors accounting for the development of periapical periodontitis⁹, and among the diversity of microorganisms which can colonise the root canal system, *Enterococcus faecalis* manage to survive in low-nutrient environment¹⁰ as this bacterium is resistant to both endodontic treatment and conventional intra-canal medications¹¹⁻¹³, thus being frequently found in the cases of secondary and persistent apical periodontitis¹¹.

Several antimicrobials have been tested in endodontics, such as calcium hydroxide and antibiotic combinations¹⁴. However, studies have revealed that some pharmaceuticals are inefficient in certain infections. Peciulienė et al.¹¹ found that *E. faecalis* is resistant to calcium hydroxide, whereas Ferrari et al.¹² observed that the same bacteria are resistant to rifamycin and ciprofloxacin.

Pharmaceutical combinations aimed at synergic action among antibiotics were proposed by Hoshino et al.¹⁵, who demonstrated the antibacterial efficacy of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline against *E. faecalis*.

However, bacteria have the ability to resist and adapt to the

secondaria e persistente¹¹. In endodonzia sono stati testati molti farmaci antimicrobici, come l'idrossido di calcio e le associazioni di antibiotici¹⁴.

Tuttavia, gli studi hanno dimostrato che alcuni farmaci sono inefficaci contro determinate infezioni. Peciulienė et al.¹¹ hanno scoperto che l'*E. faecalis* è resistente all'idrossido di calcio, mentre Ferrari et al.¹² hanno osservato che gli stessi batteri sono resistenti alla rifamicina e alla ciprofloxacina.

Le combinazioni di farmaci mirate a esercitare un'azione sinergica tra gli antibiotici sono state proposte da Hoshino et al.¹⁵, che hanno dimostrato l'efficacia antibatterica di ciprofloxacina, metronidazolo e minociclina contro l'*E. faecalis*.

Tuttavia, i batteri hanno la capacità di resistere e adattarsi all'ambiente sviluppando diversi meccanismi di resistenza ai farmaci¹⁶.

È quindi importante fare attenzione alla scelta del farmaco da usare e il grado di resistenza batterica a esso associata. In particolare, la nitrofurantoina è un nitrofurano sintetico usato per la prevenzione e il trattamento delle infezioni urinarie, che agisce contro batteri come *Escherichia coli*, *Klebsiella* ed *Enterococcus faecalis*.

L'efficacia della nitrofurantoina contro i microrganismi è sicura, dal momento che produce una resistenza ai batteri più bassa rispetto ad altri potenti antimicrobici^{17,18}.

Nonostante la sua azione positiva contro batteri che causano infezioni del tratto urinario, come l'*E. fae-*

*calis*¹⁹, non è scontato che la nitrofurantoina possa esplicare un'azione simile contro gli stessi batteri riscontrati nelle infezioni endodontiche, dal momento che questi microrganismi sono di origine esterna e il loro genotipo non corrisponde a quello dei batteri osservati nel tratto gastrointestinale²⁰.

Considerando quanto sopra e data la mancanza di studi clinici sugli effetti della nitrofurantoina sull'*E. faecalis* isolato da infezione endodontica, lo scopo del presente studio è stato quello di valutare la suscettibilità di questo microrganismo alla nitrofurantoina e di confrontare i risultati con quelli ottenuti con il Trimix (ciprofloxacina, metronidazolo e minociclina) rispetto alla loro azione antibatterica.

Materiali e metodi

Tre campioni di *E. faecalis* isolati da infezioni endodontiche, ottenuti dall'Oral Microbiology Laboratory of the Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, e un altro campione dello stesso batterio (ATCC 29212) sono stati tutti conservati in glicerolo al 30% a -20 °C.

Successivamente, i campioni sono stati miscelati con un agitatore a vortex per 30 secondi, 200 µl sono stati inoculati in 25 ml di TSB (Tryptic Soy Broth, Difco, Le Pont de Claix, RA, Francia) e quindi incubati in forno a 37 °C per 24 ore.

Gli inoculi di batteri sono stati corretti allo standard McFarland 0,5 (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, RA, Francia) e seminati su piastre Müller-Hinton agar

environment by developing different resistance mechanisms to pharmaceuticals¹⁶.

Therefore, one should be concerned with the selection of the drug to be used and its relationship with bacterial resistance. Particularly, nitrofurantoin is a synthetic nitrofuran used for prevention and treatment of urinary infections, acting against bacteria such as *Escherichia coli*, *Klebsiella* and *Enterococcus faecalis* as well. The efficacy of nitrofurantoin against microorganisms is safe, since it results in lower bacterial resistance compared to other potent antimicrobials^{17,18}. Despite its positive action against bacteria causing urinary tract infections, such as *E. faecalis*¹⁹, it becomes questionable whether nitrofurantoin would have similar action against the same bacteria found in endodontic infections, since it has been observed that these microorganisms are of external origin and their genotype does not correspond to those found in the gastrointestinal tract²⁰.

In view of the above and due to the lack of studies investigating the effect of nitrofurantoin on *E. faecalis* isolated from endodontic infection, the aim of the present study was to assess the susceptibility of this microorganism to nitrofurantoin and to compare the results with those of Trimix (ciprofloxacin, metronidazole and minocycline) regarding their antibacterial action.

MATERIALS AND METHODS

Three samples of *E. faecalis* isolated from endodontic infections, obtained from the Oral Microbiology Laboratory of the Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, and another sample of the same bacteria (ATCC 29212) were all stored in 30% glycerol at -20 °C. Next, the samples were vortexed for 30 seconds and 200 µl were inoculated into 25 µl of TSB (Tryptic Soy Broth, Difco, Le Pont de Claix, RA, France) and then incubated in stove at 37°C for 24 hours. Therefore, the bacterial inoculums were standardised at a 0.5 McFarland scale (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, RA, France) and plated onto Müller-Hinton agar (Difco, Le Pont de Claix, RA, France). Each seeded plate was identified according to the sample of *E. faecalis* used.

Paper discs were attached to the plates, which had been previously prepared depending on the group distribution as follows:

- Group 1: paper discs impregnated with 300 µg of nitrofurantoin (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil).
- Group 2 (negative control): paper discs were impregnated with antibiotic composite (Trimix) consisting of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline at a concentration of 25 µg ml⁻¹ (Fórmula e Ação, São Paulo, SP, Brasil).

(Difco, Le Pont de Claix, RA, Francia). Ogni piastra seminata è stata identificata in base al campione di *E. faecalis* utilizzato.

Sulle piastre sono stati disposti i dischetti di carta precedentemente preparati in base al gruppo di assegnazione nel modo seguente:

- Gruppo 1: dischetti di carta impregnati di 300 µg di nitrofurantoina (Laborclin, Pinhais, PR, Brasile).
- Gruppo 2: (controllo negativo): dischetti di carta impregnati di composto antibiotico (Trimix) a base di ciprofloxacina, metronidazolo e minociclina a una concentrazione di 25 µg ml⁻¹ (Fórmula e Ação, São Paulo, SP, Brasile).
- Gruppo 3: placebo (controllo positivo): dischetti di carta inumiditi solo con acqua distillata sterile, senza alcun farmaco.

Per ogni campione batterico sono stati utilizzati cinque dischetti di ciascun gruppo.

Le piastre sono state quindi incubate a 37 °C per 18 ore.

Dopo il periodo di incubazione, le piastre sono state collocate su una superficie scura, esposta a luce diretta, e il diametro dell'alone prodotto attorno al disco è stato misurato (in mm) utilizzando un righello millimetrato.

Nel test di suscettibilità alla nitrofurantoina, gli aloni di inibizione sono stati interpretati come sensibili, intermedi o resistenti, a seconda dei criteri stabiliti dal Clinical and Laboratory Stan-

dards Institute (CLSI) M100-S23, 2013 (rivisto annualmente), M02-A11, 2012 (documento sulla diffusione su disco rivisto ogni 3 anni) e CLSI 2012, 2013.

I diversi campioni di *E. faecalis* sono stati divisi in gruppi di nitrofurantoina e Trimix per essere confrontati tra loro utilizzando un test ANOVA a un livello di significanza del 5%.

Per il confronto degli effetti antibatterici di nitrofurantoina e Trimix, i dati risultanti sono stati sottoposti a un test-t indipendente a un livello di significanza del 5%.

Risultati

Il confronto tra i campioni di *E. faecalis* non ha mostrato differenze significative rispetto alla suscettibilità alla nitrofurantoina ($p > 0,05$) e al Trimix ($p > 0,05$), dimostrando così che l'*E. faecalis* isolato dal sistema del canale radicolare e il ceppo ATCC 29212 avevano comportamenti di resistenza simili.

Gli aloni di inibizione generati dalla nitrofurantoina variavano da 27 a 28 mm, conformemente ai criteri CLSI, dimostrando che tutti i campioni di *E. faecalis* testati erano suscettibili a questo farmaco e interpretati come sensibili (≥ 17 mm). Trimix invece ha prodotto aloni di inibizione più piccoli, compresi tra 22,5 e 23,5 mm, mostrando una differenza significativa rispetto alla nitrofurantoina ($p < 0,05$).

- Group 3 placebo (positive control): paper discs with no medication and moistened with sterile distilled water only.

Five discs of each group were used with each bacterial sample.

Next, the plates were incubated at 37°C for 18 hours. After the incubation period, the plates were placed on a dark surface with direct light on it, and the diameter of the halo produced around the disc was measured (in mm)

by using a millimetre ruler. In the test of susceptibility to nitrofurantoin, the inhibition halos were interpreted as being sensitive, intermediate or resistant depending on criteria established by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M100-S23, 2013 (revised yearly), M02-A11, 2012 (Disk diffusion document, revised every 3 years), and (CLSI 2012, 2013).

The different samples of *E. faecalis* were divided into groups of nitrofurantoin and Trimix in order to be compared to each other by using ANOVA test at significance level of 5%. For comparison of the antibacterial effects of nitrofurantoin and Trimix, the resulting data were submitted to independent t-test at significance level of 5%.

RESULTS

The comparison between the samples of *E. faecalis* has showed no

significant difference regarding their susceptibility to nitrofurantoin ($p > 0.05$) and Trimix ($p > 0.05$), thus demonstrating that *E. faecalis* from the root canal system as well as the strain ATCC 29212 had similar resistance behaviours.

The inhibition halos generated by nitrofurantoin ranged from 27 to 28 mm, which is in accordance with the CLSI criteria, showing that all the samples of *E. faecalis* tested were susceptible to this drug, and interpreted as being sensitive (≥ 17 mm).

On the other hand, Trimix produced smaller inhibition halos, which ranged between 22.5 to 23.5 mm, showing significant difference compared to nitrofurantoin ($p < 0.05$).

No inhibition halo was observed in the placebo group (negative control), thus demonstrating absence of any antimicrobial effect in this group. Statistical data on the halo of inhibition produced by either nitrofurantoin or Trimix in the four samples of *E. faecalis* tested can be observed in Table 1.

DISCUSSION

With the availability of useful technological tools such as automated instrumentation, electronic apical locators, digital radiography, among others, one-visit endodontic treatments have become a common

Nessun alone di inibizione è stato osservato nel gruppo placebo (controllo negativo) il che dimostra l'assenza di qualsiasi effetto antimicrobico in questo gruppo.

I dati statistici sull'alone di inibizione prodotto dalla nitrofurantoina o dal Trimix nei quattro campioni di *E. faecalis* testati possono essere osservati in Tabella 1.

Discussione

Grazie agli ausili tecnologici disponibili, come la strumentazione automatizzata, i localizzatori elettronici dell'apice, la radiografia digitale, solo per citarne alcuni, i trattamenti endodontici in una sola seduta sono diventati una pratica comune. È chiaro che eseguire un'otturazione immediata del canale radicolare è una condizione che favorisce il controllo delle infezioni.

Tuttavia, in alcune situazioni patologiche o addirittura ergonomiche, il trattamento endodontico in una sola seduta non è possibile perché è necessario utilizzare un farmaco intracanalare, in modo che gli obiettivi raggiunti attraverso la terapia non vadano persi. L'idrossido di calcio è stato per molti anni il materiale più usato in tutto il mondo, ma oggi è noto che questo farmaco presenta una limitata attività antimicrobica^{11,21,22} e che sono necessari altri farmaci più efficaci per superare questa carenza.

Con il presente studio si è cercato in particola-

re di valutare l'azione antibatterica della nitrofurantoina riguardo due aspetti: sono stati eseguiti dapprima un'analisi della suscettibilità di *E. faecalis* al farmaco e quindi un confronto con un composto di tre antibiotici (Trimix).

La metodologia utilizzata implicava il test di diffusione su disco di agar, un metodo semplice descritto in letteratura^{19,23,24}.

Nei test di suscettibilità sono state seguite le norme e i criteri stabiliti dal Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) per l'analisi antimicrobica dei farmaci puri²⁴.

L'alone di inibizione prodotto è stato confrontato con i dati del CLSI basati su una classificazione della suscettibilità batterica.

Secondo questi criteri, gli aloni di inibizione ≥ 17 mm indicano che l'*E. faecalis* è sensibile alla nitrofurantoina.

Nel presente studio, le dimensioni dell'alone di inibizione variavano da 22,5 a 23,5 mm, in media, dimostrando la suscettibilità dei campioni di *E. faecalis* alla nitrofurantoina.

Questi risultati supportano quelli riferiti da Silva et al.²³, che hanno osservato un alone di inibizione di 24,4 mm per la nitrofurantoina contro *E. faecalis*. Una questione importante da evidenziare nello studio presente è relativa all'inculo batterico usato.

L'efficacia della nitrofurantoina nei confronti di *E. faecalis* isolato da infezione urinaria e da cep-

Tabella 1 – Media $\pm$ deviazione standard dell'alone di inibizione (in millimetri) prodotto dalla nitrofurantoina o dal Trimix nei campioni di *Enterococcus faecalis*
Table 1 – Mean $\pm$ standard deviation of the halo of inhibition (in millimeters) produced by either nitrofurantoin or Trimix in the samples of *Enterococcus faecalis*

Batterio/Bacterium	Nitrofurantoina/Nitrofurantoin	Trimix
1	27,5 $\pm$ 0,50	22,9 $\pm$ 0,41
2	27,8 $\pm$ 0,27	23,2 $\pm$ 0,27
3	27,2 $\pm$ 0,27	22,8 $\pm$ 0,27
4	27,4 $\pm$ 0,22	23,3 $\pm$ 0,27

practice. It is clear that performing an immediate root canal filling is a condition favouring the control of infections.

However, in some pathological or even ergonomic situations, the one-visit endodontic treatment is not possible as it is necessary to use an intra-canal medication so that the objectives achieved through the therapy are not lost.

Calcium hydroxide was mostly used worldwide during many years, but it is known today that this medication presents a limited antimicrobial activity^{11,21,22}, and new drugs more effective are necessary in overcoming this shortcoming.

Particularly, the present study has sought to assess the antibacterial action of nitrofurantoin regarding two aspects: initially, an analysis of the susceptibility of *E. faecalis* to the drug was performed and then a comparison with a tri-antibiotic composite (Trimix).

The methodology used involved the diffusion disk agar test, since this is a simple method described in the literature^{19,23,24}.

In the susceptibility test, norms and criteria established by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) were followed for antimicrobial analysis of pure pharmaceuticals²⁴.

The halo of inhibition produced was compared to CLSI data based on a classification of bacterial susceptibility.

pi di laboratorio era già stata dimostrata in letteratura^{17-19,23}. È noto che *E. faecalis* sia il target di molti studi microbiologici in campo endodontico, a causa della sua resistenza ai trattamenti convenzionali³⁻⁶ e della sua presenza nelle infezioni persistenti¹¹. Tuttavia, l'*E. faecalis* isolato da infezione endodontica è diverso da quelli rinvenuti nel tratto gastrointestinale²⁰.

Per questo motivo, lo studio presente ha utilizzato campioni batterici isolati da infezioni endodontiche.

In questo modo sono stati ottenuti risultati specifici per la nostra pratica clinica.

L'uso del Trimix (ciprofloxacina, metronidazolo e minociclina) è giustificato dal suo attuale utilizzo in tutto il mondo come farmaco antibiotico per canali radicolari infetti^{25,26} e dal fatto che la concentrazione di 25 mg ml⁻¹ è stata stabilita negli studi di Hoshino et al.¹⁵, che hanno osser-

vato come il Trimix svolga un'attività antibatterica efficace contro campioni batterici ottenuti da canali radicolari infetti.

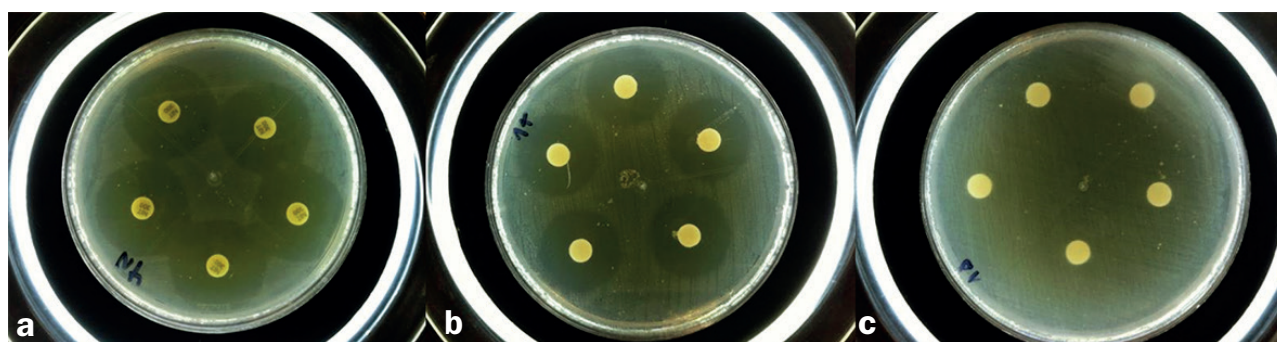
Tuttavia, la resistenza agli antibiotici acquisita dai batteri in seguito all'uso di farmaci costituisce un motivo di preoccupazione che è stato ampiamente discusso dai microbiologi^{16,17}, dal momento che l'associazione di antibiotici può addirittura aumentare tale resistenza.

In particolare, la nitrofurantoina ha dimostrato di avere bassa capacità di produrre resistenza batterica.

Rispetto ai farmaci utilizzati nel presente studio, i risultati hanno dimostrato che gli aloni di inibizione più estesi di *E. faecalis* indicano che la nitrofurantoina è un'alternativa farmacologica praticabile rispetto al Trimix.

Questi risultati sono tutti basati su un'azione diretta dei farmaci sui batteri, che dovrebbe es-

1. Alone di inibizione della nitrofurantoina (A), del Trimix (B) e del placebo (C)
1. Halo of inhibition of the nitrofurantoin (A), Trimix (B), and Placebo (C)



According to these criteria, inhibition halos ≥ 17 mm indicates that *E. faecalis* is sensitive to nitrofurantoin. In the present study, the halo of inhibition ranged from 22.5 to 23.5 mm, on average, demonstrating the susceptibility of the samples of *E. faecalis* to nitrofurantoin.

These results corroborate the findings reported by Silva et al.²³, who found an inhibition halo of 24.4 mm for nitrofurantoin against *E. faecalis*.

An important issue to be highlighted in the present study has to do with the bacterial inoculum used. The efficacy of nitrofurantoin against *E. faecalis* from urinary infection and laboratory strains had already been demonstrated in the literature^{17-19,23}.

It is known that *E. faecalis* is the target of many microbiological investigations in endodontic studies due to its resistance to conventional treatments³⁻⁶, thus being present in persistent infections¹¹.

However, *E. faecalis* from endodontic infection is different from those found in the gastrointestinal tract²⁰. For this reason, the present study has used bacterial samples from endodontic infections. In this way, the results are specific to our clinical practice.

The use of Trimix (ciprofloxacin, metronidazole and minocycline) is

justified by the fact that it is currently used worldwide as an antibiotic medication for infected root canals^{25,26}, and whose concentration of 25 mg ml⁻¹ was established in studies by Hoshino et al.¹⁵, who observed that Trimix had an effective antibacterial activity against bacterial samples from infected root canals. However, the antibiotic resistance acquired by bacteria through the use of medications is of concern, which has been largely discussed by microbiologists^{16,17}, since antibiotic combinations might further increase such resistance.

Particularly, nitrofurantoin has been shown to have low capacity to produce bacterial resistance.

With regard to the medications used in the present study, the results have shown that greater inhibition halos of *E. faecalis* indicates that nitrofurantoin is a viable alternative medication compared to Trimix.

These results are all based on the direct action of the medications on the bacteria, which should be the first test to be performed in order to assess their antimicrobial activity²⁴.

However, studies have demonstrated that dentine and presence of organic materials can influence the antimicrobial action of some medications^{21,22}. In addition, polymicrobial infections and well-

sere il primo test da eseguire al fine di valutare l'attività antimicrobica²⁴. Tuttavia, gli studi hanno dimostrato che la dentina e la presenza di materiali organici possono influenzare l'azione antimicrobica di alcuni farmaci^{21,22}. Inoltre, è necessario considerare anche le infezioni polimicrobiche e i biofilm bene organizzati. In questo contesto, dovranno essere eseguiti ulteriori test per analizzare tali fattori e completare così i risultati del nostro studio.

Conclusioni

La nitrofurantoina è stata giudicata efficace contro l'*E. faecalis* presente nelle infezioni endodontiche, con un'attività antibatterica superiore rispetto a Trimix.

Ringraziamenti

Gli autori ringraziano Fórmula & Ação per il composto antibiotico Trimix.

Bibliografia/References

1. Peru M, Peru C, Mannocci F, Shirriff M, Buchanan LS, Pitt Ford TR. Hand and nickel-titanium root canal instrumentation performed by dental students: a micro-computed tomography study. *Eur J Dent Educ* 2006; 10(1):52-9.
2. Machado MEL, Nabeshima CK, Leonardo MFP, Cardenas JEV. Análise do tempo de trabalho da instrumentação recíproca com lima única: WaveOne e Reciproc. *Rev Paul Cir Dent* 2012; 66(2):120-5.
3. Machado MEL, Sapia LAB, Cai S, Martins GHR, Nabeshima CK. Comparison of two rotary systems in root canal preparation regarding disinfection. *J Endod* 2010; 36:1238-40.
4. Machado MEL, Nabeshima CK, Leonardo MFP, Machado FPL, MLB Britto, Cai S. Valutazione dell'effetto meccanico di strumenti singoli con movimento reciprocante (sistema WaveOne) in canali radicolari contaminati. *Il Dent Mod* 2013; 31(9):110-8.
5. Machado MEL, Nabeshima CK, Leonardo MFP, Reis FAS, Britto MLB, Cai S. Influence of reciprocating single-file and rotary instrumentation on bacterial reduction on infected root canals. *Int Endod J* 2013; 46:1083-7.
6. Nabeshima CK, Caballero-Flores H, Cai S, Aranguren J, Britto MLB, Machado MEL. Bacterial removal promoted by two single-file systems: Wave One versus One Shape. *J Endod* 2014; 40(12):1995-8.
7. Vera J, Siqueira JF Jr, Ricucci D, Loghin S, Fernández N, Flores B, Cruz AG. One- versus two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a histobacteriologic study. *J Endod* 2012; 38:1040-52.
8. Paiva SS, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Carmo FL, Leite DC, Ferreira DC, et al. Clinical antimicrobial efficacy of NiTi rotary instrumentation with NaOCl irrigation, final rinse with chlorhexidine and interappointment medication: a molecular study. *Int Endod J* 2013; 46:225-33.
9. Kakeshasi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965; 20:340-9.
10. Sedgley CM, Lennan SL, Appelbe OK. Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals ex vivo. *Int Endod J* 2005; 38:735-42.
11. Peciulienė V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J* 2001; 34:429-34.
12. Ferrari PHP, Cai S, Bombana AC. Effect of endodontic procedures on enterococci, enteric bacteria and yeasts in primary endodontic infection. *Int Endod J* 2005; 38:372-80.
13. Vivacqua-Gomes N, Gurgel-Filho ED, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Recovery of *Enterococcus faecalis* after single or multiple-visit root canal treatments carried out in infected teeth ex vivo. *Int Endod J* 2005; 38:697-704.
14. Pallotta RC, Ribeiro MS, de Lima Machado ME. Determination of the minimum inhibitory concentration of four medicaments used as intracanal medication. *Aust Endod J* 2007; 33(3):107-11.
15. Hoshino E, Kurinahara-Ando N, Sato I, Uematsu H, Sato M, Kota K, et al. In-vitro antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. *Int Endod J* 1996; 29:125-30.
16. Gomes BPFA, Jacinto RC, Montagner F, Sousa EL, Ferraz CC. Analysis of the antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria isolated from endodontic infections in Brazil during a period of nine years. *J Endod* 2011; 37(8):1058-62.
17. Saunders GL, Bodonai NC. Resistance in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* encountered at the University Hospital of the West Indies, Jamaica. *West Indian Med J* 2006; 55(3):194-6.
18. Chayakul P, Hortiwakul R, Ingviya N, Chayakul V. Species distribution and antimicrobial susceptibility of *Enterococci* in hospitalized patients in southern Thailand. *J Infect Dis Antimicrob agents* 2007; 24:49-54.
19. Butt T, Leghari J, Mahmood A. In-vitro activity of nitrofurantoin in *Enterococcus faecalis* urinary tract infection. *J Pak Med Assoc* 2004; 54(9):466-9.
20. Vidana R, Sullivan A, Billström H, Ahlquist M, Lund B. *Enterococcus faecalis* infection in root canals - host derived or exogenous source? *Lett Appl Microbiol* 2011; 52(2):109-15.
21. Haapasalo HK, Sirén EK, Waltimo TM, Ørstavik D, Haapasalo MP. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. *Int Endod J* 2000; 33(2):126-31.
22. Portenier I, Haapasalo H, Rye A, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M. Inactivation of root canal medicaments by dentine, hydroxylapatite and bovine serum albumin. *Int Endod J* 2001; 34(3):184-8.
23. Silva AR, Santos EB, Pinto SCA, Gomes JC, Vaz IP, Carvalho MF. Antimicrobial effect and transdental diffusion of new intracanal formulations containing nitrofurantoin or doxycycline. *Braz Dent J* 2014; 25(5):425-9.
24. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 23rd informational supplement. CLSI M100-S23. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2014.
25. Nagata JY, Soares AJ, Souza-Filho FJ, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Gomes BP. Microbial evaluation of traumatized teeth treated with triple antibiotic paste or calcium hydroxide with 2% chlorhexidine gel in pulp revascularization. *J Endod* 2014; 40(6):778-83.
26. Torabinejad M, Milan M, Shabahang S, Wright KR, Faras H. Histologic examination of teeth with necrotic pulps and periapical lesions treated with 2 scaffolds: an animal investigation. *J Endod* 2015; 41(6):846-52.

organised biofilms should be considered as well. Within this context, further assays should be carried out to analyse these factors and thus complement the findings of our study.

CONCLUSION

Nitrofurantoin was found to be effective against *E. faecalis* present

in endodontic infections, including a superior antibacterial activity compared to Trimix.

Acknowledgements

The authors thank Fórmula & Ação for Trimix antibiotic composite.