



## ARTIGO ORIGINAL

# Efeito *in vitro* de dispositivos de alta frequência: abordagem promissora no tratamento da acne vulgar? ☆, ☆☆☆



Leonie Frommherz <sup>a</sup>, Markus Reinholz <sup>a,\*</sup>, Anne Gürtler <sup>a</sup>, Pia-Charlotte Stadler <sup>a</sup>, Till Kaemmerer <sup>a</sup>, Lars French <sup>a,b</sup> e Benjamin M. Clanner-Engelshofen <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Dermatologia e Alergia, Ludwig Maximilian University, Munique, Alemanha

<sup>b</sup> Departamento de Dermatologia & Cirurgia Cutânea Dr. Phillip Frost, University of Miami, Miller School of Medicine, Miami, Estados Unidos

Recebido em 1 de agosto de 2021; aceito em 21 de setembro de 2021

## PALAVRAS-CHAVE

Acne vulgar;  
Infecção bacteriana;  
Microbioma;  
Terapia de alta  
frequência

## Resumo

**Fundamentos:** A acne vulgar é doença inflamatória da pele que leva a um comprometimento da qualidade de vida e, portanto, não é apenas questão estética. Sua patogênese é multifatorial – de particular importância é a colonização pela bactéria *Propionibacterium acnes*. Há uma ampla gama de diferentes opções de tratamento, incluindo tratamentos tópicos e sistêmicos, dependendo da gravidade. A terapia de alta frequência (AF), desenvolvida historicamente no século XIX, alega efeitos antimicrobianos na pele com acne, mas faltam dados sólidos sobre sua eficácia e mecanismo de ação.

**Objetivos:** O objetivo principal deste estudo foi determinar a eficácia da terapia de AF na flora cutânea e *P. acnes in vitro* utilizando dispositivo comercial, bem como revisar estudos sobre o mecanismo de ação.

**Métodos:** A fonte de plasma foi investigada em relação às configurações elétricas, calor e desenvolvimento de ozônio. A flora bacteriana cutânea, isolados de fungos e *P. acnes* foram expostos à AF *in vitro* e comparados a controles não expostos, avaliando o número de colônias em placas de ágar. Para análise extra das espécies bacterianas da flora normal da pele, foi realizado o sequenciamento 16S. As análises estatísticas foram realizadas usando o test *t* não pareado para amostras armazenadas em linha.

DOI referente ao artigo:

<https://doi.org/10.1016/j.abd.2021.09.015>

☆ Como citar este artigo: Frommherz L, Reinholz M, Gürtler A, Stadler PC, Kaemmerer T, French L, et al. High-frequency devices effect in vitro: promising approach in the treatment of acne vulgaris? An Bras Dermatol. 2022;97:729–34.

☆☆ Trabalho realizado no Departamento de Dermatologia e Alergia, University Hospital, Ludwig Maximilian University, Munique, Alemanha.

\* Autor para correspondência.

E-mail: [Markus.Reinholz@med.unimuenchen.de](mailto:Markus.Reinholz@med.unimuenchen.de) (M. Reinholz).

**Resultados:** O tratamento com AF levou a redução significativa de quase todas as espécies bacterianas e fúngicas investigadas no presente estudo. Além disso, o número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *P. acnes* diminuiu significativamente após o tratamento com AF em comparação aos controles *in vitro*.

**Limitações do estudo:** Os experimentos foram realizados apenas *in vitro*; para avaliar os efeitos clínicos, são necessários mais experimentos *in vivo*.

**Conclusões:** Os resultados coletados no presente estudo, embora *in vitro*, fornecem uma base mecanicista para a AF como opção de tratamento complementar para pacientes com acne. O tratamento também pode ter efeito benéfico em pacientes com Infecções cutâneas superficiais.

© 2022 Publicado por Elsevier España, S.L.U. em nome de Sociedade Brasileira de Dermatologia. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## Introdução

A acne vulgar afeta aproximadamente 80% dos adolescentes e, portanto, é um dos motivos mais comuns de consulta com um dermatologista.<sup>1</sup> A patogênese dessa doença inflamatória cutânea é multifatorial, incluindo aumento da produção de sebo, queratinização folicular alterada, colonização bacteriana por *Propionibacterium acnes* e inflamação.<sup>2-4</sup> Ela é dividida em quatro graus, de leve (incluindo comedões e poucas pápulas inflamatórias) a grave (associando nódulos inflamatórios e formação de cicatrizes).<sup>5</sup> Além disso, a acne é considerada doença estigmatizante que induz baixa autoestima e retraimento social, também refletido por alto escore no *Dermatology Life Quality Index* (DLQI), semelhante àquele de pacientes com psoríase vulgar.<sup>6</sup> Assim, a demanda por tratamentos eficazes é particularmente alta. Há uma infinidade de opções de tratamento, desde medicamentos de venda livre até terapias orais, incluindo retinóides e antibióticos. Recentemente, os dispositivos de alta frequência ganharam cada vez mais atenção, alegando ajudar a drenagem linfática, prevenir a queda de cabelos e o desenvolvimento de rugas e, por fim, melhorar as lesões de acne. Esses dispositivos de alta frequência, coloquialmente denominados *violet wand* (VW), fornecem Plasma de Pressão Atmosférica Frio (CAPP, do inglês *cold atmospheric pressure plasma*). O CAPP tem múltiplas propriedades bioativas – por exemplo, pela liberação de partículas carregadas e radicais reativos (O<sub>3</sub>, NO, NO<sub>2</sub>).<sup>7</sup> No início do século passado, a terapia de alta frequência (AF) já era conhecida como opção de tratamento versátil em pacientes com doenças infecciosas da pele, eczema e feridas. Além disso, até enxaquecas, neuralgia, tuberculose e muitas outras doenças foram tratadas por esse método.<sup>8</sup> Provavelmente em decorrência do desenvolvimento dos antibióticos e por falta de dados sobre sua eficácia, tornou-se menos importante em meados do século passado. Não apenas por seus efeitos antimicrobianos como “antisséptico físico” mas também pelo aumento global de cepas bacterianas multirresistentes, a medicina do plasma é atualmente um campo emergente, e os estudos em andamento são onipresentes. Recentemente, foi demonstrado que os dispositivos de AF são mais eficazes do que os antissépticos comuns no ataque contra patógenos de feridas *in vitro*,<sup>7,8</sup> questionando se a terapia de AF também pode ser benéfica na pele com propensão a acne e como ela afeta a flora comum da pele.

## Materiais e métodos

### Fonte de plasma

Neste estudo, o dispositivo *Signstek Portable High Frequency Machine* (Signstek, Full Rise LLC, Wilmington, DE/EUA) com marcação CE (aprovada para uso em seres humanos na Europa) foi utilizado. Consiste em dispositivo portátil com um regulador de intensidade na parte inferior e uma saída para conectar diferentes tubos de vidro preenchidos com hélio abaixo da pressão atmosférica. São fornecidos quatro tubos de vidro diferentes: um tubo em formato de pente para tratar o couro cabeludo, um tubo em formato de língua para áreas sensíveis (como olheiras, nariz ou lábios), outro em formato de cogumelo para grandes áreas (regiões frontal e dorsal) e um tubo curvo com ponta esférica para áreas regulares como a região bucinadora (fig. 1a).

Em todos os experimentos relatados aqui, o tubo curvo foi utilizado a uma frequência de trabalho de 50 Hz A intensidade foi regulada em 50%.

### Medidas técnicas

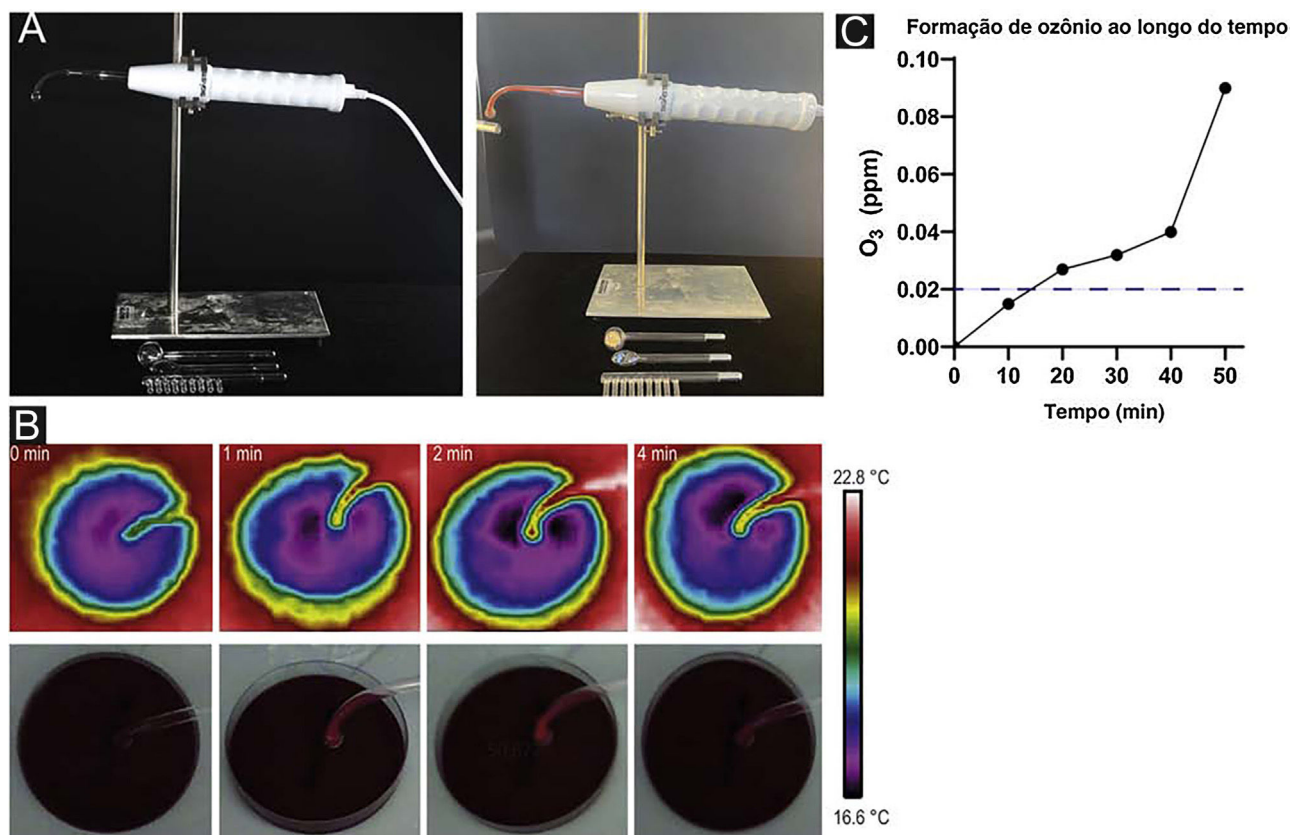
A intensidade da corrente foi medida para três condições (potência baixa, média e máxima) utilizando amperímetro padrão (Multimeter ABB Metrawatt 2012). A tensão aplicada correspondia à da tomada elétrica (na Alemanha: 230 V).

### Avaliação do desenvolvimento de calor

Para investigações adicionais sobre o mecanismo preciso de ação da fonte de plasma, uma câmera de imagem térmica (FLIR MS Technology C3, FLIR® Systems, Inc., Wilsonville, Oregon, EUA) foi utilizada para detectar o potencial desenvolvimento de calor. As fotos foram tiradas após 1, 2 e 4 minutos de tratamento de uma placa de ágar com AF para se assemelhar a um experimento com bactérias.

### Formação de ozônio

A concentração de ozônio (O<sub>3</sub>) foi medida utilizando um detector de O<sub>3</sub> (Leory PM 2.5 O<sub>3</sub> Ozondetektor TVOC, Thingnovation, Shenzhen, China). A fonte de plasma foi ligada a 100% em uma sala com janelas e portas trancadas, de



**Figura 1** Fonte de plasma e efeitos do mecanismo. (A) O dispositivo de plasma é composto por um dispositivo portátil com ajuste de intensidade e diferentes tubos de vidro para conectar. Há formação de plasma de cor laranja quando ligado. (B) Fotos tiradas com câmera termográfica após 0, 1, 2 e 4 minutos sem nenhum sinal de desenvolvimento de calor. (C) Formação de ozônio durante o tempo medido por um detector de O<sub>3</sub> demonstrando aumento da concentração de O<sub>3</sub> já depois de 10 minutos. A linha tracejada indica a concentração limite de odor para ozônio (20-40 µg/m<sup>3</sup>; 0,01-0,02 ppm).

aproximadamente 10,5 m<sup>3</sup>. Os tempos de medida foram aos 10, 20, 30, 40 e 50 minutos.

## Microbiologia

### Bacteriologia

Para estudar os efeitos da terapia de AF sobre as bactérias, foram obtidos swabs de pele saudável em três áreas diferentes do corpo (região frontal, antebraço e área genital) de um indivíduo saudável. Em um segundo experimento, *Propionibacterium acnes* (ATCC® 6919™) foi testado separadamente.

### Micologia

Para avaliar adicionalmente os efeitos sobre fungos, isolados clínicos de *Trichophyton mentagrophytes*, *T. violaceum*, *T. mentagrophytes*, *T. benhamiae*, *T. rubrum* e *Microsporum canis*, preparados por assistentes médico-laboratoriais, foram tratados conforme mencionado a seguir.

### Culturas de bactérias/fungos

A flora da pele de três diferentes áreas do corpo foi isolada em placas de ágar sangue e incubada por 24 horas a 37 °C antes do tratamento com AF.

*Propionibacterium acnes*, como bactéria anaeróbica, foi cultivada em um frasco anaeróbico (BD BACTEC™ Lytic/10 Anaerobic/F Culture Vial) até atingir densidade celular aproximada de  $3,0 \times 10^8$  UFC/mL referente ao padrão McFarland n° 1, e em seguida tratada com AF em uma placa de ágar sangue. Após o tratamento, as placas foram incubadas por sete dias a 37 °C em condições anaeróbicas usando BD GasPak™. Espécies fúngicas foram cultivadas em BD Dermatophyte Agar por sete dias a 37 °C antes do tratamento.

### Modelo in vitro para testes de alta frequência em bactérias/fungos

Após a incubação, cada colônia investigada foi ressuspensa em aproximadamente 0,5 mL de solução salina 0,9% estéril. Para a flora da pele, foram escolhidas cinco colônias de aparência morfológicamente diferente para avaliação posterior. Em seguida, 1 µL da solução microbiana foi aplicado centralmente nas placas de ágar apropriadas em pares. Em seguida, o dispositivo de AF com o tubo curvo anexado e desinfetado com lenço umedecido foi fixado em um suporte a uma distância de 5 mm acima da placa. De cada par, uma placa foi tratada por 1 minuto, enquanto a outra serviu como controle para determinar a diferença relativa. No caso de *P. acnes*, os períodos de tratamento variaram entre 1 e

8 minutos (1, 2, 4 e 8 minutos de tratamento de AF). Subsequentemente, a solução microbiana de placas tratadas e não tratadas foi espalhada utilizando esferas de vidro esterilizadas, seguido por um período de incubação a 37 °C por um dia para a flora da pele e sete dias para *P. acnes* e fungos. Após a incubação, em placas com aproximadamente mais de 1.000 colônias, três áreas de 1 cm<sup>2</sup> foram contadas em cada placa de ágar, e os valores médios foram multiplicados pelo tamanho da placa de ágar (57 cm<sup>2</sup>) para obter o número absoluto de colônias por placa. Placas com 100 a 1.000 colônias foram divididas em quartos, e um quarto contado foi multiplicado por quatro, enquanto placas com menos de 100 colônias foram contadas de maneira completa.

## Sequenciamento 16S

As colônias bacterianas de cada par de placas foram ainda caracterizadas por meio de PCR (Kit HotStarTaq Master Mix, Qiagen), como descrito anteriormente.<sup>9</sup>

Os primers 27f (5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC A-3') e 1492r (5'-TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') amplificaram parcialmente o rRNA do gene 16S usando um termociclador (Biometra Professional Basic, Analytik Jena GmbH, Jena, Alemanha).

Os produtos de DNA foram detectados por eletroforese em gel de agarose a 1,0% para confirmar uma amplificação bem sucedida. O sequenciamento de Sanger foi realizado pela Eurofins Genomics (Ebersberg, Alemanha) utilizando o primer 27f. As sequências obtidas foram alinhadas usando a ferramenta online BLASTn para identificar as espécies (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; NCBI).<sup>10</sup>

## Análise estatística

Para observação e análises estatísticas (teste *t* de Student não pareado para amostras armazenadas em linha) foi utilizado o GraphPad Prism (versão 9.0.0, GraphPad Software Inc, San Diego, CA/USA) e os dados foram dispostos em gráficos em escala logarítmica. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os valores a seguir são apresentados como média ± desvio padrão. O nível de significância foi estabelecido em  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) e  $p < 0,001$  foram considerados altamente significativos (\*\*\*).

## Resultados

### Avaliação de dados técnicos e mecanismo de ação

Para avaliar a intensidade da corrente elétrica durante o tratamento, foi utilizado um multímetro mostrando corrente variando de 0,28 (potência total) a 0,32 ampère (potência baixa) na tensão de 230 V.

O desenvolvimento de calor após 1, 2 e 4 minutos de tratamento com AF não foi observado. As fotos tiradas com câmera termográfica não mostraram alterações na temperatura durante o período investigado (fig. 1 B).

A formação de ozônio com concentração de 0,015 ppm foi observada após 10 minutos do dispositivo totalmente ligado. Após 20 minutos, as concentrações de O<sub>3</sub> quase dobraram ( $c = 0,027$  ppm). Com tempos maiores os níveis

de concentração aumentaram ( $c = 0,032$  após 30 minutos,  $c = 0,040$  após 40 minutos,  $c = 0,090$  após 50 minutos; fig. 1 C).

## Efeitos da terapia de alta frequência contra a flora cutânea

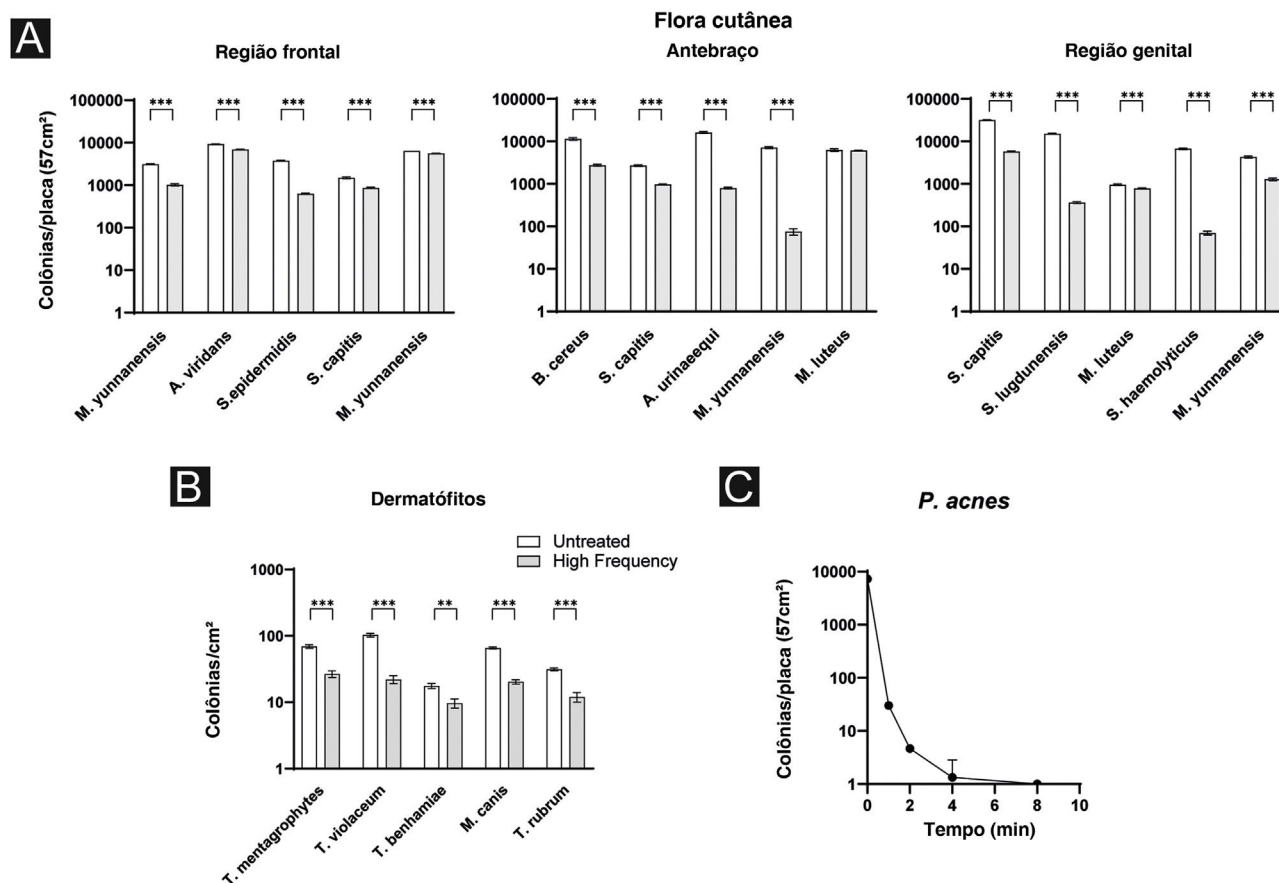
Para avaliar a eficácia da terapia de AF contra a flora comum da pele, as placas de ágar sangue com e sem tratamento de AF foram contadas após o período de incubação seguido por PCR para especificar as espécies bacterianas. Em termos gerais, para quase todas as espécies identificadas, observou-se redução significativa na contagem de colônias. Mais precisamente, na região frontal, detectamos duas vezes *Micrococcus yunnanensis*, *Aerococcus viridans*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus capitis*. *Micrococcus yunnanensis* foi reduzido em 67,5% (31267,0 ± 81,7 vs. 1016,3 ± 57,1;  $p < 0,001$ ) e na segunda placa em 12,5% (6405,0 ± 18,5 vs. 5605,3 ± 19,4;  $p < 0,001$ ), *A. viridans* em 26,1% (9339,0 ± 72,1 vs. 6906,3 ± 58,8;  $p < 0,001$ ), *S. epidermidis* em 83,43% (3785,7 ± 68,7 vs. 627,3 ± 18,2;  $p < 0,001$ ) e *S. capitis* em 41,9% (1488,0 ± 70,4 vs. 864,3 ± 30,3;  $p < 0,001$ ).

O mesmo foi observado para as bactérias do antebraço: *B. cereus* foi reduzido em 75,9% (11396,3 ± 757,7 vs. 2750,7 ± 127,9;  $p < 0,001$ ), *S. capitis* em 63,9% (2700,3 ± 104,0 vs. 973,7 ± 25,1;  $p < 0,001$ ), *A. urinaeequi* em 95,1% (16201,0 ± 757,9 vs. 800,0 ± 35,0;  $p < 0,001$ ), *M. yunnanensis* em 99,0% (7209,3 ± 344,8 vs. 75,0 ± 12,8;  $p < 0,001$ ) e *M. luteus* em 3,1% (6280,0 ± 443,3 vs. 6087,7 ± 119,3;  $p = 0,5$ ).

Em relação às espécies bacterianas na região genital, *S. capitis* foi reduzido em 81,6% (31699,3 ± 763,7 vs. 5839,7 ± 111,3;  $p < 0,001$ ), *S. lugdunensis* em 97,6% (15214,3 ± 405,1 vs. 363,3 ± 16,2;  $p < 0,001$ ), *M. luteus* em 17,9% (957,0 ± 37,6 vs. 785,3 ± 22,3;  $p = 0,002$ ), *S. haemolyticus* em 99,0% (6684,0 ± 273,0 vs. 70,0 ± 7,2;  $p < 0,001$ ), *M. yunnanensis* em 70,3% (4322,0 ± 252,3 vs. 1284,3 ± 86,4;  $p < 0,001$ ; fig. 2 A).

## Efeitos da terapia de alta frequência contra dermatófitos

O próximo passo do presente estudo foi avaliar adicionalmente os efeitos do tratamento da AF contra uma seleção aleatória de dermatófitos. O número total de colônias de todos os dermatófitos foi significativamente reduzido em 58,0% após o tratamento com AF (55,8 ± 33,6 vs. 18,2 ± 6,5;  $p = 0,040$ ). Mais precisamente, as colônias de *T. mentagrophytes* foram reduzidas em 61,5% (69,3 ± 4,0 vs. 26,7 ± 3,1;  $p < 0,001$ ), de *T. violaceum* em 78,6% (103,0 ± 6,6 vs. 22,0 ± 3,0;  $p < 0,001$ ), de *T. benhamiae* em 45,2% (17,7 ± 1,5 vs. 9,7 ± 1,5;  $p = 0,003$ ), de *M. canis* em 69,1% (65,7 ± 2,1 vs. 20,3 ± 1,5;  $p < 0,001$ ) e de *T. rubrum* em 61,6% (31,3 ± 1,5 vs. 12,0 ± 2,0;  $p < 0,001$ ; fig. 2 B).



**Figura 2** Efeitos antimicrobianos da terapia de AF. (A) Tratamento com AF mostra diminuição significativa da contagem de bactérias e (B) fungos *in vitro*. (C) UFC de *P. acnes* são significativamente reduzidas após 1 minuto, e a continuação do tratamento leva a redução adicional.

### Efeitos da terapia de alta frequência contra *P. acnes*

Uma abordagem adicional para verificar se o tratamento de AF é benéfico contra *P. acnes*, este foi tratado por AF ao longo do tempo (fig. 2 C). As UFC em diferentes placas de ágar sangue foram contadas antes e após 1, 2, 4 e 8 minutos de tratamento com AF. Resultados significativos foram alcançados após 1 minuto de tratamento ( $7288,0 \pm 145,9$  vs.  $30,0 \pm 3,6$ ;  $p < 0,001$ ). A continuação do tratamento por 2, 4 e 8 minutos levou a diminuição ainda maior da quantidade de UFC. Ao comparar os valores após 2 e 4 minutos de tratamento, observou-se redução ainda mais significativa do número de UFC de *P. acnes* ( $4,7 \pm 0,6$  vs.  $1,3 \pm 1,5$ ;  $p = 0,020$ ). O tratamento prolongado por mais de 8 minutos pareceu não ter benefícios adicionais ( $1,3 \pm 1,5$  vs.  $1 \pm 0$ ;  $p = 0,700$ ; fig. 2 C).

### Discussão

No presente estudo, o tratamento com AF demonstrou efeito microbicida na flora da pele e patógenos *in vitro*, com diminuição significativa nas contagens bacterianas e fúngicas após curto período de tratamento.

Embora tenha sido demonstrado que os dispositivos de AF não funcionem por meio do desenvolvimento de calor, foi observado aumento da formação de  $O_3$  durante o tempo de aplicação, sugerindo que seus principais efeitos antimicrobianos são provavelmente mediados pelo desenvolvimento de gás ozônio e, portanto, estresse oxidativo para os micróbios. Sabe-se que o  $O_3$  tem efeito anti-inflamatório com propriedades antimicrobianas.<sup>11,12</sup> Em altas concentrações (geralmente  $> 200 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ,  $> 0,1$  ppm) por períodos prolongados de tempo, o  $O_3$  pode contribuir para o desenvolvimento de doenças pulmonares, como DPOC ou enfisema,<sup>13,14</sup> mas a quantidade de  $O_3$  no tratamento de AF é muito pequena e o tempo de aplicação muito curto para causar problemas de saúde. Foi possível demonstrar que a flora cutânea de três áreas diferentes do corpo, incluindo diferentes bactérias aeróbicas, foi significativamente reduzida após 1 minuto de tratamento com AF. De acordo com o que foi mostrado, um estudo anterior demonstrou erradicação completa *in vitro* de isolados de feridas bacterianas.<sup>8</sup> Além disso, os resultados do presente estudo estão de acordo com os achados de um estudo de 2015, mostrando que CAPP e VW podem reduzir uma variedade de bactérias, incluindo cepas multirresistentes como *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina (MRSA) e *Enterococcus* resistente à vancomicina (ESBL), bem como fungos, como a levedura *Candida albicans*. Os efeitos antimicrobianos da VW não diferiram de

maneira relevante dos dispositivos modernos de AF.<sup>7</sup> O presente estudo e estudos anteriores destacaram claramente as propriedades antissépticas das terapias de AF, sugerindo que a AF, no lugar de antibióticos, pode ser opção de tratamento antimicrobiano alternativo para infecções superficiais de fácil acesso, especialmente porque as cepas bacterianas multirresistentes estão aumentando. Além disso, o efeito antimicrobiano também é importante para a redução da colonização por *P. acnes*, pois foi possível demonstrar redução significativa após 1 minuto de tratamento com o dispositivo de AF. Uma vez que *P. acnes* é uma causa chave na patogênese da acne vulgar, sua redução pode representar importante opção de tratamento complementar.

## Conclusão

Os resultados coletados neste estudo, embora *in vitro*, fornecem uma base mecanicista para a AF como opção de tratamento complementar para pacientes com acne. Também pode ter efeito benéfico em pacientes com infecções cutâneas superficiais. Como os resultados *in vitro* são promissores, mais estudos *in vivo* são necessários para comprovar a eficácia e a tolerabilidade na prática diária com seguimentos em longo prazo para monitorar possíveis efeitos colaterais.

## Suporte financeiro

Nenhum.

## Contribuição dos autores

Leonie Frommherz: Obteve e analisou os dados e redigiu o manuscrito.

Markus Reinholz: Obteve e analisou os dados e redigiu o manuscrito.

Anne Gürtler: Obteve dados, revisou-os e fez a revisão do manuscrito.

Pia-Charlotte Stadler: Obteve dados, revisou-os e fez a revisão do manuscrito.

Till Kaemmerer: Obteve dados, revisou-os e fez a revisão do manuscrito.

Lars French: Obteve dados, revisou-os e fez a revisão do manuscrito.

Benjamin M. Clanner-Engelshofen: Obteve e analisou os dados e redigiu o manuscrito.

## Conflito de interesses

Nenhum.

## Referências

1. Bhate K, Williams HC. Epidemiology of acne vulgaris. *Br J Dermatol*. 2013;168:474–85.
2. Barbieri JS. A New Class of Topical Acne Treatment Addressing the Hormonal Pathogenesis of Acne. *JAMA Dermatol*. 2020;156:619–20.
3. Contassot E, French LE. New insights into acne pathogenesis: propionibacterium acnes activates the inflammasome. *J Invest Dermatol*. 2014;134:310–3.
4. Kurokawa I, Danby FW, Ju Q, Wang X, Xiang LF, Xia L, et al. New developments in our understanding of acne pathogenesis and treatment. *Exp Dermatol*. 2009;18:821–32.
5. Kraft J, Freiman A. Management of acne. *CMAJ*. 2011;183:E430–5.
6. Cresce ND, Davis SA, Huang WW, Feldman SR, et al. The quality of life impact of acne and rosacea compared to other major medical conditions. *J Drugs Dermatol*. 2014;13:692–7.
7. Daeschlein G, Napp M, Podewils S, Scholz S, Arnold A, Emmert S, et al. Antimicrobial Efficacy of a Historical High-Frequency Plasma Apparatus in Comparison With 2 Modern. Cold Atmospheric Pressure Plasma Devices. *Surg Innov*. 2015;22:394–400.
8. Napp J, Daeschlein G, Napp M, von Podewils S, Gumbel D, Spitzmueller R, et al. On the history of plasma treatment and comparison of microbiostatic efficacy of a historical high-frequency plasma device with two modern devices. *GMS Hyg Infect Control*. 2015;10. Doc08.
9. Clanner-Engelshofen BM, French LE, Reinholz M. *Corynebacterium kroppenstedtii* subsp. *demodicis* is the endobacterium of *Demodex folliculorum*. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2020;34:1043–9.
10. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990;215:403–10.
11. Sharma M, Hudson JB. Ozone gas is an effective and practical antibacterial agent. *Am J Infect Control*. 2008;36:559–63.
12. Lovato ECW, Velasquez PAG, Oliveira CS, Baruffi C, Anghinoni T, Machado RC, et al. High frequency equipment promotes antibacterial effects dependent on intensity and exposure time. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2018;11:131–5.
13. Kim SY, Kim E, Kim WJ. Health Effects of Ozone on Respiratory Diseases. *Tuberc Respir Dis (Seoul)*. 2020;83:56–11.
14. Jerrett M, Burnett RT, Pope CA, Ito K, Thurston G, Krewski D, et al. Long-term ozone exposure and mortality. *N Engl J Med*. 2009;360:1085–95.