

Estudo comparativo de dois eletrodos associados ao plasma elétrico de alta frequência na redução do crescimento de cepas clínicas de *Malassezia* spp.

Comparative study of two electrodes associated to high frequency electric plasma in the reduction of the growth of clinical strains of Malassezia spp.

Ana Beatriz Furtado Rodrigues¹, Raissa Albano da Silva²,
 Raduan Hage³, Sônia Khouri⁴.

RESUMO

Introdução: *Malassezia* spp. é um gênero leveduriforme, comumente isolado da microbiota normal do conduto auditivo de cães, que possui espécies associadas a otites externas e dermatites atópicas. O plasma elétrico é considerado o quarto estado da matéria, que vem sendo empregado na descontaminação e esterilização. **Objetivo:** Avaliar os efeitos do plasma elétrico de alta frequência, utilizando dois diferentes eletrodos de vidro, na redução do crescimento de cepas clínicas de leveduras do gênero *Malassezia* spp. **Material e Métodos:** Nove amostras de *Malassezia* spp., isoladas do conduto auditivo de cães com otite externa, foram tratadas durante 6 minutos com plasma elétrico de alta frequência por meio de dois diferentes eletrodos de vidro. Após 72 horas de incubação em estufa, as amostras foram analisadas e comparadas com amostras controle. **Resultados:** Verificou-se que nas amostras tratadas com plasma de alta frequência, por meio do eletrodo esférico maior, houve uma redução considerável no número de unidades formadoras de colônias, cerca de 82%, em relação ao controle positivo. **Conclusão:** O plasma de alta frequência mostrou-se como uma técnica promissora no controle *in vitro* de cepas clínicas de *Malassezia* spp. induzindo um percentual médio de redução de 82% quando tratadas com o eletrodo do tipo esférico, o mesmo não foi observado quando utilizado o eletrodo do tipo cauterizador que apresentou um percentual de redução médio de apenas 32%.

Descritores: *Malassezia* spp. Cães. Otite externa. Gases de plasma. Plasma a frio.

ABSTRACT

Introduction: *Malassezia* spp. is a yeast gene, commonly abnormal of the microbiota of the auditory canal of dogs, which has species associated to external otitis and atopic dermatitis. The electric plasma is considered the fourth state of matter, which has been used in decontamination and sterilization. **Aim:** to evaluate the effects of high frequency electric plasma, using two different dosages of glass, in reducing the growth of clinical strains of yeasts of the genus *Malassezia* spp. **Material and Methods:** Nine samples of *Malassezia* spp. isolated from the auditory canal of dogs with external otitis were treated for 6 minutes with high frequency electric plasma through two different glass electrodes. After 72 hours of incubation in the greenhouse, the samples were analyzed and compared with control. **Results:** It was verified that in the tests treated with high frequency plasma, by means of the larger spherical electrode, there was a considerable reduction in the number of colony forming units, about 82%, in comparison to the positive control. **Conclusion:** High-frequency plasma showed to be a promising non-invasive technique of clinical strains of *Malassezia* spp. The average percentage of reduction of 82% when treated with the spherical type, the same was not done when using the type of control cauterizador that reduced the average percentage of only 32%.

Keywords: *Malassezia* spp. Dogs. Cold plasma. Plasma gases

¹Discente do curso Biomedicina, Universidade do Vale do Paraíba/UNIVAP.

E-mail:

beatrizrodrigues.abfr@gmail.com

²Discente do curso de Biomedicina, Universidade do Vale do Paraíba/UNIVAP.

³Médico Veterinário, doutor, docente na Universidade do Vale do Paraíba, Universidade do Vale do Paraíba/UNIVAP

⁴Biomédica, doutora, docente e coordenadora do curso de Biomedicina da Universidade do Vale do Paraíba, Universidade do Vale do Paraíba/UNIVAP.

1. INTRODUÇÃO

Malassezia spp. é um gênero de levedura, do filo Basidiomiceto, que compreende, de acordo com estudos recentes, cerca de 15 espécies lipofílicas, sendo a maioria delas lipidiodependentes e apenas uma não lipidiodependente. Este fungo é comumente isolado da microbiota normal da pele, conduto auditivo e mucosas de cães, mas também pode ser encontrado na microbiota de seres humanos, aves e outros mamíferos. Esta levedura apresenta espessa parede celular, formada por quitina e lipídeos em abundância. Este último fator auxilia na proteção contra a atividade de antifúngicos, dificultando seu tratamento e controle. Contudo, a patogenicidade desta levedura pode estar relacionada à características do hospedeiro, como desordens hormonais ou imunológicas, que favorecem seu crescimento como oportunista.¹⁻⁶

Diversas espécies de *Malassezia* spp. foram associadas as infecções cutâneas e as otites externas e dermatites atópicas em cães. Conforme dados da literatura, as otites externas provocadas por espécies do gênero *Malassezia* podem ser observadas em cães jovens e sadios, sendo *Malassezia furfur* e *Malassezia pachydermatis* as principais espécies isoladas na prática veterinária. As otites podem se manifestar em decorrência de causas primárias, como alergias alimentares e sistema imunológico do hospedeiro deficiente, mas também quando ocorre alguma alteração no conduto auditivo, tais como mudanças de temperatura, pH ou umidade, permitindo que este micro-organismo deixe de viver como comensal e se torne um patógeno oportunista.^{1,2,4,6,7}

Segundo a física, o plasma é considerado o quarto estado da matéria e está presente em todo o universo. Ele pode ser encontrado como um gás ou vapor, ionizado ou energizado, que pode ser criado a partir de aplicação de energia, na forma de calor ou campo eletromagnético, descargas elétricas (como relâmpago) ou reações nucleares controladas. Para que o plasma seja gerado, é necessário haja uma diferença de potencial elétrico, que promova a excitação do gás, acelerando suas partículas. Logo, as moléculas de um gás (como hélio, oxigênio e argônio) depois de excitadas, perdem seus elétrons, gerando uma mistura de partículas carregadas positiva e negativamente, em igual proporção, íons negativos e positivos, entre outras espécies reativas.^{3,8-12}

Há dois tipos de plasma: os de baixa temperatura, também chamados de não-térmicos, e os de alta temperatura, ou térmicos. Os plasmas de alta temperatura são menos

usados devido à elevada temperatura que é preciso para produzi-los (cerca de 3000°C). Por outro lado, os plasmas de baixa temperatura podem ser produzidos a partir de micro-ondas e rádio frequência, quando gases são estimulados à pressão atmosférica ou à baixa pressão, como os gerados a vácuo. ^{8,10,13}

O plasma vem sendo empregado na área industrial, por exemplo, na modificação de superfícies e, mais atualmente, na desinfecção e esterilização de materiais na área médica e dispositivos odontológicos. Entretanto, este uso ainda não é amplamente difundido. Por este motivo, seu uso no controle microbiano vem sendo mais pesquisado. Estudos mais recentes têm demonstrado que o plasma apresenta amplo espectro de ação sobre micro-organismos, pois não possibilita a formação de resistência. Apesar disso, príons e esporos necessitam ser tratados por mais tempo se comparados aos demais micro-organismos quando se deseja eliminá-los. Sendo assim, o plasma pode servir como uma alternativa limpa e que não gera resíduos, mas também na redução e inativação microbiana. ¹¹⁻¹⁴

Contudo, os mecanismos de ação dos plasmas não estão totalmente elucidados. Sabe-se que o gás, depois de ionizado, tem seus átomos e moléculas fragmentados, produzindo espécies reativas, íons e elétrons. Logo, sabe-se que as espécies reativas reagem com a membrana das células, mas também com moléculas em sua superfície e com ácidos nucleicos e proteínas internas das células. Sugere-se que a inativação dos micro-organismos pode ser decorrente de danos ao DNA, pela radiação UV ou pela atividade citotóxica de espécies reativas geradas pelo plasma. Pode ocorrer ainda modulação proteica e indução da apoptose. ^{11,14,15}

Um estudo realizado por Taghizadeh et al.³ cujo objetivo foi empregar o plasma não-térmico na inativação de biofilmes de três diferentes micro-organismos (*Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*) demonstrou que ele foi capaz de reduzir o crescimento microbiano. Isto indica que o plasma apresentou efetiva atividade antimicrobiana, assim como outros trabalhos também evidenciaram. Ademais, um estudo realizado por Ouf, Basher e Mohamed (2014), empregou plasma no controle de esporos do fungo *Aspergillus niger* em frutas, e mostrou que ele promoveu a redução destes esporos, sendo necessário, porém, maior tempo de exposição dos micro-organismos ao plasma, conforme outros estudos também já sugeriram. Por este motivo, a eliminação de micro-organismos depende não apenas do tempo de exposição da amostra ao plasma, mas também da distância da mesma em relação ao jato e da intensidade aplicada. ^{11,12,14,16}

O plasma pode ser produzido a partir de um gerador de alta frequência. Este gerador é um equipamento que fornecerá uma corrente de alta frequência a partir de uma corrente elétrica que, unido a um eletrodo de vidro que contém um gás, levará a formação do plasma.

3, 9, 12

Um dos gases mais empregados na formação do plasma é o ozônio. Este gás vem sendo empregado em diversas situações, como o tratamento de feridas, graças a sua atividade oxidativa, que pode ser útil na esterilização e descontaminação, mas também na redução e inibição do crescimento de micro-organismos *in vitro* ou *in vivo*. Isto se dá, segundo estudos recentes propõem, pelo fato de que o ozônio pode comprometer a permeabilidade celular e oxidar aminoácidos e ácidos nucleicos.^{3,10,12}

O objetivo do presente estudo foi comparar os efeitos do plasma elétrico de alta frequência, utilizando-se dois tipos de eletrodos, esférico e tipo cauterizador, na redução do crescimento de cepas clínicas de *Malassezia* spp. isoladas do conduto auditivo externo de cães com sinais clínicos de otite externa.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo se trata de um estudo experimental, realizado entre os meses de agosto e novembro de 2018, no Núcleo de Estudos Farmacêuticos e Biomédicos (NUFABI) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP).

Inicialmente, foram colhidas 18 amostras do conduto auditivo externo de cães com sinais clínicos de otite externa, atendidos em um hospital veterinário, no serviço de dermatologia, na cidade de São José dos Campos, por uma médica veterinária dermatologista. As amostras foram colhidas com *swabs* secos estéreis que depois foram passados em placas de Petri com ágar Sabouraud com cloranfenicol a 0,05%. Estas placas foram levadas ao NUFABI, onde foram incubadas em estufa a 35°C (\pm 2°C), por 72 horas.

Das 18 amostras colhidas, 09 foram confirmadas com coloração de Gram como positivas para *Malassezia* spp., e empregadas no estudo. As demais amostras foram descartadas devido à presença de contaminantes e à contagem inferior a 25 exemplares de *Malassezia* spp. observadas ao microscópio. Depois de isoladas e cultivadas, iniciaram-se os testes, realizados em duplicata, com os dois eletrodos de vidro. Para isto, foram preparados inóculos das amostras de *Malassezia* spp., cultivadas 72 horas antes de cada experimento. Os inóculos foram preparados em solução salina 0,9%, seguindo a escala de

turvação 0,5 de Mac Farland. Então, os inóculos foram diluídos até 1:100, em eppendorfs estéreis, com volume total de 1 mL. Deste inóculo, 120 µL foram pipetados em um poço de uma placa de Kline, que foi disposta a 1 cm de distância do eletrodo, exposto ao plasma elétrico de alta frequência por 6 minutos, tempo esse determinado em estudo piloto. Logo após, 100 µL da solução tratada foram pipetados em uma placa de ágar Sabouraud com cloranfenicol a 0,05% e colocadas em estufa a 35°C, por 72 horas.

Com o intuito de analisar se o tipo de eletrodo utilizado poderia interferir nos efeitos do plasma de alta frequência sobre a formação de UFCs, dois diferentes eletrodos foram utilizados e assim foram criados diferentes grupos no presente estudo: Grupo I - tratado com o eletrodo de vidro do tipo esférico maior; Grupo II - tratado com o eletrodo de vidro do tipo cauterizador; Grupo controle positivo – contendo apenas o inóculo de *Malassezia* spp. sem qualquer tratamento; Grupo controle negativo: contendo o inóculo de *Malassezia* spp. associado ao nitrato de Miconazol (0,02 g/mL).

Transcorrido o tempo de incubação de 72 horas, as placas foram retiradas da estufa, foi feita a contagem de UFCs/mL e determinação do percentual de redução de cada amostra e os resultados foram tabulados.

Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa de Animais da Universidade Paulista, sob o protocolo de aprovação nº 055/16.

3. RESULTADOS

Os resultados obtidos após a contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs/mL) dos grupos tratados (Grupos I e II) e dos grupos controle (positivo e negativo) encontram-se dispostos na tabela 1. Nota-se que houve redução no número de UFCs/ml em ambos os grupos tratados com plasma elétrico de alta frequência, porém no grupo I, que utilizou o eletrodo esférico maior, a redução foi muito maior em relação àquele que utilizou o eletrodo do tipo cauterizador.

Tabela 1. Valores médios de UFCs/mL e respectivos percentuais de redução dos diferentes grupos de amostras. O grupo controle negativo (*Malassezia* spp. + miconazol) não foi inserido na tabela pois não houve formação de UFCs em nenhuma das amostras.

Amostras	Grupo I			Grupo II		
	(eletrodo do tipo esférico)			(eletrodo do tipo cauterizador)		
	Controle positivo	Teste	% redução	Controle positivo	Teste	% redução
1	$5,40 \times 10^4$	$1,40 \times 10^3$	97%	$1,38 \times 10^6$	$8,55 \times 10^5$	38%
2	$1,48 \times 10^7$	$4,92 \times 10^6$	67%	$1,62 \times 10^6$	$1,50 \times 10^6$	7%
3	$5,10 \times 10^4$	$2,20 \times 10^4$	57%	$2,40 \times 10^5$	$1,70 \times 10^5$	29%
4	$4,60 \times 10^4$	$9,00 \times 10^3$	80%	$1,15 \times 10^5$	$4,0 \times 10^4$	65%
5	$3,35 \times 10^5$	$5,00 \times 10^3$	98%	$2,75 \times 10^5$	$1,85 \times 10^5$	33%
6	$8,30 \times 10^4$	$1,00 \times 10^3$	99%	$7,05 \times 10^5$	$6,60 \times 10^5$	74%
7	$5,24 \times 10^6$	$1,72 \times 10^6$	67%	$1,48 \times 10^6$	$1,02 \times 10^6$	31%
8	$2,00 \times 10^4$	0	100%	$6,80 \times 10^5$	$5,70 \times 10^5$	16%
9	$2,50 \times 10^4$	$6,00 \times 10^3$	76%	$5,20 \times 10^5$	$2,70 \times 10^5$	48%

4. DISCUSSÃO

Atualmente, sabe-se que a gama de antifúngicos convencionais é pequena e que os fungos têm apresentado crescente aumento de resistência ao uso dos mesmos. Além disso, os tratamentos disponíveis muitas vezes geram efeitos colaterais. Visto isso, há necessidade de se encontrar novos métodos seguros e confiáveis, que possam ser empregados nos tratamentos de infecções fúngicas.

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, verificou-se que o plasma elétrico de alta frequência apresentou efeito inibitório sobre o crescimento de cepas clínicas de *Malassezia* spp. É possível notar ainda que o percentual de redução de UFCs/mL foi maior naquelas amostras tratadas com o eletrodo do tipo esférico maior do que nas amostras tratadas com o eletrodo do tipo cauterizador. Tal diferença pode estar associada a maior superfície do eletrodo esférico levando a maior difusão do plasma nos inóculos,

consequentemente exercendo maior efeito inibitório sobre o crescimento dos micro-organismos. Liao et al ¹⁵ notaram que a eficiência do plasma a frio na inativação de micro-organismos depende do tipo de plasma empregado, do tipo de superfície em que o micro-organismos se encontra e do tipo de micro-organismo testado. Além disso, há fatores, como temperatura ambiente, matriz celular, pH, tempo de exposição e características dos micro-organismos que influenciam na ação do plasma. Essas observações corroboram com o presente estudo, no qual foi possível notar a marcante diferença de efeitos do plasma elétrico sobre o crescimento das cepas de *Malassezia* spp. alterando-se apenas o tipo de eletrodo utilizado, onde o eletrodo esférico promoveu um efeito muito mais intenso comparado ao tipo cauterizador, demonstrado por meio do percentual de redução de UFCs.

Annunziata et al ²¹ observaram que o plasma a frio foi eficaz na remoção de bactérias contaminantes de superfícies de titânio e, por este motivo, poderia ser uma alternativa eficiente para descontaminar e até mesmo esterilizar superfícies.

No estudo de Lee et al ²³ foram testadas cepas padrão de *E. coli*, *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* com plasma de gás nitrogênio e gás hélio misturado ao gás oxigênio, num tempo de tratamento de 10 minutos. Como resultado, foi visto que o plasma a frio foi capaz de inativar as cepas tratadas, havendo redução das cepas de *S. Typhimurium* de 1.6 para 1.5 log. Contudo, notaram que a inativação depende não somente do tempo de tratamento, mas também de fatores externos, como pH do meio. Deste modo e, com base nos resultados apresentados no presente trabalho, mais estudos são necessários empregando o plasma de alta frequência, com um tempo maior de irradiação, mas também com um número maior de amostras. Isto porque, para a realização do presente estudo foi realizado inicialmente um ensaio em que foram testados diferentes tempos de irradiação, contando com os seguintes tempos: 3, 6, 9 e 12 minutos, baseados em um estudo anterior feito com o mesmo plasma e as mesmas amostras e no qual observou-se que um tempo de tratamento inferior a 3 minutos não apresentava redução no número de UFCs.

Uma hipótese para justificar este tempo maior de exposição poderia estar no fato de que o presente estudo foi realizado com cepas clínicas. As cepas foram obtidas de diferentes cães e, por isso, podem apresentar diferentes características comportamentais e moleculares entre si. E, ao compararmos com cepas padrão, que são mais sensíveis, pode-se justificar a provável resistência ao tratamento empregado.

Como relatado anteriormente, pode-se notar que há variação na contagem de UFCs/mL das amostras e que isto se deve ao fato de que foram utilizadas amostras clínicas,

colhidas de diferentes cães. Logo, a variação de crescimento, mas também de resistência mediante o tratamento, podem ser decorrentes de diferenças existentes dentro de um mesmo gênero.

Os trabalhos realizados por Ziuzina^{19,20} evidenciaram que o plasma a frio foi eficiente no controle de *Salmonella Typhimurium*, *E. coli* e *L. monocytogenes* isolados de tomate, tomate cereja, morango e alface. Nestes estudos foi observada inibição do crescimento de isolados de *Salmonella Typhimurium* obtidos de tomate, após 10 segundos de tratamento, e inibição do crescimento de isolados de alface após 30 segundos de tratamento. Foi verificado ainda que houve diminuição de 3.1 log₁₀ para 2 log₁₀ das amostras de *E. coli* após 45 segundos de tratamento com o plasma. Apesar da variação de tempo entre o estudo de Ziuzina^{19,20} e o presente estudo, 10 segundos e 300 segundos (6 minutos), respectivamente, pode-se sugerir, com base na observação dos resultados, a grande capacidade inibitória do plasma de alta frequência no crescimento de diferentes tipos de micro-organismos.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O plasma de alta frequência apresentou-se como uma técnica promissora no controle de cepas clínicas de *Malassezia* spp. *in vitro*, principalmente utilizando-se o eletrodo do tipo esférico, que cujo percentual de redução médio do número de UFCs/mL das cepas testadas foi de 82%.

REFERÊNCIAS

1. Bandeira IB, Nunes AG, Vandesmet MLCS. *Malassezia* sp. revisión literaria sobre los aspectos generales. Unicatólica. 2016;1(88).
2. Böhmová E, Čonková E, Sihelská Z, Harčárová M. Diagnostics of *Malassezia* Species: A Review. *Folia Vet* [Internet]. 2018;62(2):19–29. Available from: <http://content.sciendo.com/view/journals/fv/62/2/article-p19.xml>
3. Eduardo C, Braz C, Solange P, Nunes RD, Denise S, Herrera SC, et al. Aplicação de aparelho de alta frequência e do vapor de ozônio no fungo *malassezia* spp Application of high-frequency equipment and steam ozone in the fungus *malassezia* spp. *Rev Amaz Sci Heal*. 2014;(63):29–34.
4. Brilhante RSN, Rocha MG da, Guedes GM de M, Oliveira JS de, Araújo G dos S, España JDA, et al. *Malassezia pachydermatis* from animals: Planktonic and biofilm antifungal susceptibility and its virulence arsenal. *Vet Microbiol*. 2018;220(May):47–52.
5. Carrillo-Muñoz AJ, Rojas F, Tur-Tur C, de los Ángeles Sosa M, Diez GO, Espada CM, et al. *In vitro*

antifungal activity of topical and systemic antifungal drugs against *Malassezia* species. *Mycoses*. 2013;56(5):571–5.

6. Celis AM, Vos AM, Triana S, Medina CA, Escobar N, Restrepo S, et al. Highly efficient transformation system for *Malassezia furfur* and *Malassezia pachydermatis* using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *J Microbiol Methods* [Internet]. 2017;134:1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2017.01.001>.
7. Almeida MDS, Santos SB, Mota ADR, Da Silva LTR, Silva LBG, Mota RA. Isolamento microbiológico do canal auditivo de cães saudáveis e com otite externa na região metropolitana de Recife, Pernambuco. *Pesqui Vet Bras*. 2016;36(1):29–32.
8. Afshari R, Hosseini H. Non-thermal plasma as a new food preservation method, Its present and future prospect. *J Paramed Sci Winter*. 2014;5(1):2008–4978.
9. Bampi GM. AÇÃO BACTERICIDA (IN VITRO) DO GERADOR DE ALTA FREQUÊNCIA SOBRE CULTURA BACTERIANA COMUMENTE ENCONTRADA EM FERIDAS CRÔNICAS. Diss Univ Caxias do Sul, Programa PósGraduação em Biotecnol 2015 [Internet]. 2015 Mar; Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-06032011000100033&lng=pt&tlng=pt
10. Melo FL de. Efeitos Do Processamento Por Plasma Atmosférico Sobre As Características de Qualidade em Suco de Uva “Isabel”. 2015.
11. Shintani H (Hideharu), Sakudo A. Gas plasma sterilization in microbiology : theory, applications, pitfalls and new perspectives [Internet]. [cited 2018 Nov 30]. 157 p. Available from: https://books.google.com.br/books?id=mXA7DwAAQBAJ&pg=PA39&lpg=PA39&dq=shintani+sakudo&source=bl&ots=QruShfQ0LJ&sig=XqZ_3xGemQiRYXTYQc_FYsKH-2E&hl=pt-BR&sa=X&ved=2ahUKEwjF7LDJ7PzeAhWJHZAKHYsuAvgQ6AEwAnoECAgQAQ#v=onepage&q=shintani sakudo&f=false.
12. Wietzikoski Lovato EC, Gurgel Velasquez PA, dos Santos Oliveira C, 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. Colombo LMPC, Matafora FL, Moro AFV. Condicionamento de superfícies na Odontologia com plasma de argônio: uma revisão de literatura. *Rev Bras Odontol* [Internet]. 2014;71(1):85–8. Available from: http://revodonto.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-72722014000100018.
14. Ouf SA, Basher AH, Mohamed AAH. Inhibitory effect of double atmospheric pressure argon cold plasma on spores and mycotoxin production of *Aspergillus niger* contaminating date palm fruits. *J Sci Food Agric*. 2015;95(15):3204–10.
15. Liao X, Liu D, Xiang Q, Ahn J, Chen S, Ye X, et al. Inactivation mechanisms of non-thermal plasma on microbes: A review. *Food Control* [Internet]. 2017 May [cited 2018 Nov 20];75:83–91. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713516307113>.
16. Taghizadeh L, Brackman G, Nikiforov A, Van Der Mullen J, Leys C, Coenye T. Inactivation of biofilms using a low power atmospheric pressure argon plasma jet; the role of entrained nitrogen. *Plasma Process Polym*. 2015;12(1):75–81.
17. Álvarez-Pérez S, García ME, Peláez T, Blanco JL. Genotyping and antifungal susceptibility testing of multiple *Malassezia pachydermatis* isolates from otitis and dermatitis cases in pets: Is it really worth the effort? *Med Mycol*. 2016;54(1):72–9.
18. Leong C, Buttafuoco A, Glatz M, Bosshard PP. crossm Antifungal Susceptibility Testing of. *J Clin Microbiol*. 2017;55(6):1883–93.
19. Ziuzina D, Patil S, Cullen PJ, Keener KM, Bourke P. Atmospheric cold plasma inactivation of *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Listeria monocytogenes* inoculated on fresh produce.

Food Microbiol [Internet]. 2014;42:109–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.02.007>.

20. Ziuzina D, Han L, Cullen PJ, Bourke P. Cold plasma inactivation of internalised bacteria and biofilms for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. Int J Food Microbiol [Internet]. 2015;210:53–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.05.019>.
21. Annunziata M, Canullo L, Donnarumma G, Caputo P, Natri L, Guida L. Bacterial inactivation/sterilization by argon plasma treatment on contaminated titanium implant surfaces: In vitro study. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2016;21(1):e118–21.
22. Pankaj SK, Keener KM. Cold plasma: background, applications and current trends. Curr Opin Food Sci [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2018 Nov 20];16:49–52. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214799316301278>.
23. Lee H, Kim JE, Chung MS, Min SC. Cold plasma treatment for the microbiological safety of cabbage, lettuce, and dried figs. Food Microbiol [Internet]. 2015;51:74–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2015.05.004>.