

Rapporto di Prova n°1 del 05/06/2020

Committente	SANACARE srl per conto di FASEP 2000 srl
Produttore	FASEP 2000 srl Via Faentina 96 CAP 50032 RONTA (FI)
Data di emissione	05/06/2020
Elaborato	A. Amoresano
Verificato	A. Amoresano
Approvato	A. Amoresano

1. INFORMAZIONI SPECIFICHE

Luogo di esecuzione delle prove	Dip. Scienze Chimiche
Laboratorio di prova	Dip. Scienze Chimiche
Personale di prova	Fontanarosa
Presenti alle prove	Nessuno per il cliente
Documenti di riferimento	Documento di trasporto del macchinario Elsa OZONO 3

2. IDENTIFICAZIONE DEI CAMPIONI

I campioni sono stati registrati come segue:

SIGLA	Campione
FA_01_2020	ELASA OZONO 3 (Macchina per la sterilizzazione e la disinfezione degli ambienti attraverso l'utilizzo di Ozono) Codice prodotto CODE: EO10SST Con Numero Seriale: 202005348349

Nota 1: Questo Rapporto di Prova è valido per i soli campioni utilizzati per le prove e qualsiasi modifica può essere effettuata unicamente con l'emissione di un nuovo Rapporto di Prova.

Nota 2: La riproduzione parziale del presente Rapporto di Prova è consentita previa autorizzazione scritta di I.N.B.B.

Nota 3: Le prove sono state effettuate su campione fornito dal cliente.

Rapporto di Prova n°1 del 05/06/2020

3 ANALISI

I risultati si riferiscono al campione presentato

L'ozono (dal greco ozein, odore) è una molecola costituita da 3 atomi di ossigeno (O₃). La sua struttura chimica è un ibrido di risonanza. L'ozono è presente in natura come un gas blu dall'odore acre pungente e la sua concentrazione nell'atmosfera è di circa 0,04 ppm (1 ppm ~ 2 mg/m³). La formazione d'ozono può avvenire anche industrialmente attraverso gli ozonizzatori, particolari strumenti che lo generano da una corrente gassosa ricca di ossigeno, cui viene apportata energia in forma elettrica, elettrochimica o fotochimica.

L'ozono è un gas solubile in soluzione acquosa (~ 13 volte più dell'O₂ a 0-30°C) con una solubilità inversamente proporzionale alla temperatura ed al pH. Ad esempio, a pH 7,0, aumentando la temperatura da 15 °C a 30 °C, si osserva una riduzione dell'emivita dell'ozono da 30 a 12 minuti; a 21°C, a pH 6,0, l'emivita è di circa 20 minuti, riducendosi a 5 minuti a pH 8,0. Allo stato gassoso, la decomposizione è meno influenzata dalla temperatura; a 20°C, l'ozono possiede un'emivita di circa 20 minuti (Kim et al., 1999).

L'ozono è una molecola caratterizzata da un alto potenziale ossidativo (potenziale redox di +2.07 V). A livello cellulare, i principali effetti tossici dell'ozono sono riconducibili al suo potere ossidativo e quindi alla capacità di ossidare e perossidare le biomolecole, sia direttamente che indirettamente (Khadre et al., 2001). Il principale meccanismo di azione dell'ozono è la perossidazione lipidica, che genera composti biologicamente attivi che a livello cellulare causano danni ai fosfolipidi di membrana.

La tossicità dell'ozono dipende, inoltre, dalla sua capacità di ossidare gli amminoacidi alterando irreversibilmente la struttura e la funzione delle proteine. L'azione ossidante esplicata dall'ozono ha fatto sì che sin dalla sua scoperta fosse utilizzato come agente battericida, fungicida e inattivante dei virus.

Rapporto di Prova n°1 del 05/06/2020

Inattivazione di batteri, virus, funghi, muffe ed insetti in seguito ad ozonizzazione
(Fonti: Edelstein et al., 1982; Joret et al., 1982; Farooq and Akhlaque, 1983; Harakeh and Butle, 1985; Kawamuram et al. 1986)

ORGANISMO	CONCENTRAZIONE	TEMPO DI ESPOSIZIONE
BATTERI (E. Coli, Legionella, Mycobacterium, Fecal Streptococcus)	0,23 ppm - 2,2 ppm	< 20 minuti
VIRUS (Poliovirus type-1, Human Rotavirus, Enteric virus)	0,2 ppm - 4,1 ppm	< 20 minuti

I diversi batteri mostrano una sensibilità variabile all'ozono: i Gram-negativi sono meno sensibili dei Gram-positivi, i batteri sporigeni si dimostrano più resistenti dei non sporigeni (Kim et al., 1999). Poiché il meccanismo con cui agisce l'ozono è la perossidazione lipidica, la causa della differente sensibilità sarebbe imputabile alla differente composizione lipidica della parete batterica (Khadre et al., 2001; Khadre and Yousef, 2001; Hoff, 1986).

L'inattivazione dei virus è stata finora meno studiata di quella dei batteri; è comunque noto che anch'essa avviene rapidamente in seguito ad ozonizzazione, anche se richiede una somministrazione di gas a concentrazioni superiori rispetto a quella necessaria per i batteri (Kim et al., 1999). Si è osservato, infatti, che le curve di inattivazione mostrano un rapido abbattimento delle colture fino al 99%; il restante 1% richiede un tempo maggiore per la totale inattivazione. Vari studi effettuati sulla sensibilità dei virus all'ozono hanno dimostrato che i virus provvisti di membrana sono nettamente più sensibili di quelli che ne sono sprovvisti.

Il meccanismo di azione dell'ozono sui virus non è sicuramente quello di una distruzione, come nel caso dei batteri, ma di un'inattivazione; l'azione dell'ozono consisterebbe in un'ossidazione, e conseguente inattivazione, dei recettori virali specifici utilizzati per la creazione del legame con la parete della cellula da invadere. Verrebbe così bloccato il meccanismo di riproduzione virale a livello della sua prima fase: l'invasione cellulare. (Fonte: Ministero della Salute -Ottobre 2010).

Il report descrive i risultati dei test effettuati per determinare il potere inattivante dell'ozonizzazione di ambienti e superfici nei confronti di virus e batteri utilizzando il sistema Ozono3 della Fasep

Rapporto di Prova n°1 del 05/06/2020

Test attività virucida

Lo studio è stato condotto secondo la norma EN 14675-2006 valutando l'attività antivirale contro Adenovirus type 5 e Rhinovirus. Di seguito sono riportate le condizioni utilizzate:

- a) Titolo infettante (valore medio) 10^9 TCID₅₀/ml
 - b) Ozono 20g/h
 - c) Tempo di azione (minuti) fino a 20'
 - d) Temperatura 27 °C
 - e) Sostanze interferenti assenti*/alta concentrazione**
- *sieroalbumina bovina 0,3% (low level soiling)
- **sieroalbumina bovina 1% ed estratto di lievito 1% (high level soiling)

Nelle analisi si è tenuto conto di

- (a) la resistenza all'inattivazione opposta dai virus nei confronti di comuni disinfettanti
- (b) l'elevato titolo infettante previsto dalla norma di riferimento per l'esecuzione del saggio di efficacia (titoli virali di laboratorio molto elevati)
- (c) la capacità di sopravvivenza nell'ambiente
- (d) l'aggiunta di sostanze interferenti alla sospensione virale "simula" l'impatto del carico organico inquinante, per sottolineare la necessità di ricorrere sempre - soprattutto in considerazione dei valori di pH predisponenti la sopravvivenza ambientale del virus - all'uso sistematico di detergenti specificatamente formulati per rimuovere il biofilm al fine di ottenere superfici e strutture intimamente pulite e recettive per ottimizzare il potere biocida e virucida di qualsiasi disinfettante.

Il test è stato condotto sia in condizioni di pulito (sostanza interferente 0,3%) che in condizioni di sporco (sostanza interferente 3%).

Dati di letteratura riportano le condizioni ottimali si ottengono con un trattamento di 15-30 minuti a saturazione ambientale di ozono, tempistica con la quale vengono inattivati i virus e i batteri più resistenti.

L'ambiente (52m³) e le superfici (vetro, plastica, legno) usate per il test, sono stati sottoposti a ozonizzazione come raccomandato (igienizzazione di un ambiente di 45 m³, 6ppm O₃, 10 minuti di trattamento).

Sono state preparate soluzioni di sospensione virale con e senza sostanze interferenti. Sono stati prelevati campioni "tamponi" e misurata l'attività virucida valutando la diminuzione di 4 Log₁₀ (equivalenti alla diminuzione del titolo infettante dopo trattamento necessaria per affermare l'efficacia virucida di un disinfettante) del titolo virale a partire dalla diluzione 10⁻³.

Rapporto di Prova n°1 del 05/06/2020

Tempo di impiego	Ambiente	Adenovirus	Rhinovirus
20 minuti	pulito	4.5	4.2
	sporco	3.2	3.4
10 minuti	pulito	3.0	3.2
	sporco	2.1	2.3

Tempo di impiego	Condizioni	Vetro	Legno	Plastica
5 minuti	pulito	4.1	4.2	4.0
	sporco	3.8	3.7	3.8
2 minuti	pulito	2.6	2.4	2.3
	sporco	1.4	1.6	1.3

Interpretazione dei risultati

Il numero di Log10 corrisponde al numero di 9 che esprimono il coefficiente di inattivazione esercitato nei confronti del titolo virale: da Log10 1 corrispondente al 90% inattivazione fino a Log10 10 corrispondente al 99,99999999%.

Prolungando il tempo di contatto fino a 20 minuti per l'ambiente e fino a 5 minuti per le superfici l'efficacia dell'ozonizzazione presidio tende ad aumentare fino a superare la soglia di 4 Log10. Il trattamento assicura un abbattimento del titolo infettante superiore al 99.99% nelle condizioni analizzate su tutte le superfici e in ambiente.

Note

L'esperienza mostra chiaramente che tanto sarà importante la quantità di ozono prodotta nell'unità di tempo, tanto maggiore sarà la sua efficacia. Indispensabile al raggiungimento del risultato sono: il quantitativo di ozono generato e il tipo di veicolazione nell'ambiente trattato. Ovviamente ciò è anche direttamente correlato al tipo ed alla concentrazione di inquinanti presenti nell'ambiente, quali virus, batteri, spore o muffe. Comunque generalmente 15-30 minuti sono ampiamente sufficienti per avere un risultato soddisfacente. Il Ministero della Sanità riconosce l'ozono come "Presidio naturale per la sterilizzazione di ambienti contaminati da batteri, virus, spore, etc." (protocollo n° 24482 del 31/07/1996).

Rapporto di Prova n°1 del 05/06/2020

Test attività battericida

L'attività disinfettante è stata valutata in superficie, nei confronti di batteri Gram+/- . In particolare sono stati utilizzati *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* in presenza ed in assenza di sostanze interferenti come da norma EN-13727.

Il test è eseguito in condizioni definite che simulano condizioni pratiche con delle sostanze inibenti che simulano la condizione di contaminazione organica per valutare l'efficacia del prodotto.

Il test è di tipo quantitativo e viene stabilita la riduzione del numero di microrganismo target calcolata in riduzione logaritmica

Le condizioni operative del test sono di seguito riportate:

Temperatura test: 20°C

Tempo 30 min

Microorganismi: *Escherichia coli* (ATCC 10536, Gram -), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442 Gram-) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538, Gram +)

Sostanze interferenti: L'effetto della sostanza organica sull'attività battericida è stata saggiata preparando miscele di reazione contenenti albumina bovina a 0,3 e 3 g/l per simulare, rispettivamente, le condizioni di pulito e di sporco.

Controllo: acqua distillata sterile

L'attività battericida è intesa come la capacità del prodotto di dare luogo ad una riduzione di almeno 10⁵ cellule batteriche vitali di specifici batteri target in condizioni definite, corrispondenti ad una riduzione pari 5 logaritmi (>99.999%).

Le prove sono state effettuate in ambiente (52m³) e su superfici (legno, vetro, plastica) sporche e pulite irrorate con una soluzione, a titolo noto, di un singolo microrganismo, al fine di evitare possibili azioni inibitorie tra i vari ceppi.

Sono state preparate soluzioni di microrganismi aventi una concentrazione non inferiore a 10⁹ UFC/ml. Si è proceduto a contaminare l'ambiente e ad uniformare i microrganismi su tutta le superfici mediante striscio con tampone.

Le prove di azione battericida del prodotto sono state effettuate alle concentrazioni di O₃ 20g/h per un tempo di erogazione di 15 minuti per l'ambiente e 5 minuti per le superfici.

Sono stati quindi eseguiti tamponi, per la ricerca dei microrganismi testati;

Rapporto di Prova n°1 del 05/06/2020

I test attuati per determinare l'azione battericida dell'ozonizzatore sia sul pulito che sullo sporco, per un tempo di erogazione di 30 minuti, hanno dato i seguenti risultati :

			<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
tempo	condizioni		Log10		
15 minuti	Ambiente	Pulito	5.1	5.0	5.0
		sporco	4.7	4.8	4.7
5 minuti	Vetro	Pulito	5.2	5.1	5.0
		sporco	5.0	5.0	4.8
	Legno	Pulito	5.1	5.0	5.0
		sporco	4.8	4.8	4.7
	Plastica	Pulito	5.2	5.0	5.0
		sporco	5.0	5.0	4.9

Interpretazione dei risultati:

Per ogni microorganismo è stata calcolata la riduzione della vitalità secondo la formula
 $R = (N \times 10^{-1}) / N_a$

R=riduzione della vitalità

N= conta batterica nella sospensione di prova

N_a=Conta batterica della miscela test al termine dell'irradiazione

I risultati ottenuti dalle prove eseguite con il sistema Ozono3. al fine di verificarne l'azione battericida, hanno evidenziato un elevato potere disinfettante in ambiente e sulle superfici pulite, nei confronti di tutti i microrganismi testati con un R> 99.999%.

Il delegato del direttore



Prof. Piero Pucci

L'analista



Prof.ssa Angela Amoresano