



Documento originale in inglese.  
Traduzione all'Italiano: Prof. Dario Apuzzo.  
Membro di ISCO3  
Presidente A.I.R.O. (Accademia Internazionale di Ricerca  
in Ossigeno-Ozono Terapia).  
Medico Chirurgo Specialista in Medicina Fisica e  
Riabilitazione

Comitato Scientifico Internazionale d'Ozonoterapia ISCO3. ISCO3 / EPI / 00/04.

### **Uso potenziale dell'ozono nella SARS-CoV-2 / COVID-19.**

Parere Ufficiale degli Esperti del Comitato Scientifico Internazionale di Ozonoterapia (ISCO3).  
ISCO3 / EPI / 00/04 (Madrid, 14 marzo 2020). Approvato da ISCO3 il 13/03/2020.

Autori del documento originale: Adriana Schwartz, Segretario Scientifico ISCO3, Gregorio Martínez-Sánchez, Presidente del ISCO3.

## Indice

Disconoscimento.....	2
Abbreviazione / Acronimi.....	3
Sommario.....	4
Parole chiave.....	5
Introduzione.....	5
Disinfezione ambientale.....	7
Azioni terapeutiche dell'ozono nelle malattie virali.....	9
Vie di somministrazione consigliate.....	11
Protocollo clinico raccomandato con O <sub>3</sub> SS.....	11
Protocollo preventivo con O <sub>3</sub> SS.....	11
Protocollo interventistico con O <sub>3</sub> SS.....	11
Dispositivi (Generatori di ozono e monouso).....	12
Osservazioni conclusive.....	12
Riferimenti.....	13



## Disconoscimento

I documenti dell'ISCO3 sono raccomandazioni che possono diventare linee guida e un riferimento per tutti coloro che praticano ozono terapia. Tuttavia, spetta a ogni ozonoterapeuta seguire *la sua / il suo giudizio clinico nell'attuazione delle raccomandazioni formulate dall' ISCO3.*

Tutte le pubblicazioni tecniche di ISCO3 o sotto il nome di ISCO3, tra cui i codici di condotta, le procedure di sicurezza e ogni altra informazione tecnica contenuta in esse, sono state ottenute da fonti ritenute attendibili e si basano su informazioni tecniche ed esperienze attualmente disponibili da membri dell'ISCO3 e altri alla data della loro emissione.

Mentre ISCO3 e i suoi membri raccomandano il riferimento o l'uso delle loro pubblicazioni, tali riferimenti non risultano vincolanti per gli ozonoterapeuti, che volontariamente decideranno di applicarli o meno, pertanto ISCO3 e i suoi membri, non danno alcuna garanzia di risultati e non si assumono alcuna responsabilità in relazione all'uso di informazioni o suggerimenti contenuti nelle pubblicazioni di ISCO3.

ISCO3 non ha alcun controllo per quanto riguarda le prestazioni, le corrette applicazioni o le interpretazioni errate, di qualsiasi informazione o suggerimento contenuti in pubblicazioni di ISCO3, fatte da qualsiasi persona o ente (compresi i membri dell'ISCO3) e quindi ISCO3 declina espressamente qualsiasi responsabilità.

Le pubblicazioni di ISCO3 sono soggette a revisione periodica e gli utenti sono invitati a richiedere l'ultima edizione.

**L'unica versione ufficiale di questo documento è quella pubblicata in inglese.**

**Nota:** Il documento "Uso potenziale dell'ozono nella SARS-CoV-2 / COVID-19" è stato elaborato, discusso e approvato dall'ISCO3 avendo in considerazione tre punti chiave:

1. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), agenzia specializzata delle Nazioni Unite, il cui mandato è la salute pubblica, ha ufficialmente riconosciuto che "al momento, non ci sono vaccini o trattamenti farmaceutici specifici disponibili per COVID-19."<sup>1</sup>
2. Per combattere questa pandemia l'OMS ha chiamato i paesi "a prendere misure urgenti e aggressive", affermando che "questa non è solo una crisi di salute pubblica, è una crisi che toccherà ogni settore - così ogni settore e ogni individuo devono essere coinvolti nella lotta."<sup>2</sup> ISCO3, come parte del settore sanitario del mondo, vuole essere coinvolto nella lotta contro questa pandemia.
3. Poiché non ci sono "vaccini o trattamenti farmaceutici specifici disponibili" questo documento rappresenta un contributo per combattere il coronavirus, che propone **l'uso potenziale dell'Ozonoterapia**, come terapia complementare, esclusivamente sulla base dei dati scientifici disponibili, come è spiegato in dettaglio in questo documento.



## Abbreviazione / Acronimi

ACE2: Enzima di conversione dell'angiotensina 2.

CDC: Centri per il Controllo e la Prevenzione della Malattia (USA).

COVID-19: Malattia da Coronavirus 19.

CT: Tomografia Computerizzata.

Eboo: Ossigenazione-Ozonizzazione extracorporea del sangue.

EPA: *Environmental Protection Agency* (USA).

FDA: *Food and Drug Administration* (USA).

GSH: Glutazione

HSP: Proteine di Shock Termico.

MAH: Grande autoemoterapia.

MIAH: Piccola autoemoterapia.

MSC: Cellule Staminali Mesenchimali.

O3SS: Soluzione Salina Ozonizzata.

OSHA: *Occupational Safety and Health Administration* (USA).

SARS-CoV-2: Sindrome Severa Acuta Respiratoria per Coronavirus 2.

UC: Cordone Ombelicale.

OMS: Organizzazione Mondiale della Sanità.

Suggerimento su come citare questo documento: ISCO3. Uso potenziale di ozono nella SARS-CoV-2 / COVID-19. Madrid, 2020. Comitato Scientifico Internazionale di Ozonoterapia [www.isco3.org](http://www.isco3.org) (Consultato il XX / XX / XX).



## Sommario

La comparsa della sindrome respiratoria acuta grave da coronavirus 2 (SARS-CoV-2; provvisoriamente chiamato 2019 nuovo coronavirus o 2019-nCoV) o malattia COVID-19 in Cina, alla fine del 2019, ha causato una grande epidemia globale ed un grave problema pubblico di salute. La COVID-19 è stata definita come una "pandemia" dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS). La maggior parte dei dati ufficiali recenti e disponibili al 12 marzo 2020, ha dimostrato che a oggi, quasi 125.000 casi sono stati segnalati dall'OMS, provenienti da 118 paesi e territori. Nelle ultime due settimane, il numero di casi segnalati fuori dalla Cina è aumentato di quasi 13 volte e il numero di paesi colpiti è quasi triplicato.<sup>3</sup> "4.291 persone hanno perso la vita (...) nei giorni e nelle settimane a venire, ci aspettiamo di vedere il numero di casi, il numero di morti e il numero di paesi colpiti aumentare ancora"<sup>2</sup> Lo scopo di questo lavoro è quello di supportare **"l'uso potenziale dell'Ozono come terapia complementare"** nella gestione di COVID-19. Le parole chiave per acquisire informazioni scientifiche sono state: ozono, SARS-CoV-2 e COVID-19.

L'ozono può essere utilizzato nella disinfezione di ambienti contaminati virali. La sua massima efficacia antivirale richiede un breve periodo di umidità elevata (> 90% di umidità relativa), dopo il raggiungimento della concentrazione di gas ozono di (20 - 25 ppm, 39-49 mg / m<sup>3</sup>). Essendo un gas, può penetrare in tutte le aree all'interno di una stanza, tra cui fessure, infissi, tessuti, stanze d'ospedale, trasporti pubblici, camere d'albergo, cabine delle navi da crociera, uffici, ecc e sotto le superfici dei mobili, molto più efficacemente rispetto alle applicazioni manuali di spray liquidi e aerosol. **L'ambiente da trattare deve essere privo di persone e animali a causa della relativa tossicità dell'ozono se assunto per la via inalatoria.**

L'ozono terapia sistemica può essere **"potenzialmente"** utile nel trattamento della SARS-CoV-2. Il meccanismo d'azione è già stato dimostrato clinicamente in altre infezioni virali ed ha dimostrato di essere altamente efficace negli studi di ricerca. I meccanismi d'azione sono: 1) induzione di adattamento allo stress ossidativo, quindi un riequilibrio dello stato redox cellulare. 2) Induzione di IFN-gamma e citochine pro infiammatorie. 3) Aumento del flusso sanguigno e ossigenazione dei tessuti degli organi vitali. 4) Ha le potenziali azioni di agire come un auto-vaccino quando somministrato in forma di piccola autoemoterapia.

Le vie di somministrazione raccomandate sono: Grande Autoemoterapia (MAH), Soluzione Salina Ozonizzata (O<sub>3</sub>SS), Ossigenazione-Ozonizzazione Extracorporea del Sangue (EBOO), e una variante della Piccola Autoemoterapia (MIAH). Il protocollo clinico deve essere rispettato con le dosi e le procedure standard, come definito nella Dichiarazione di Ozonoterapia di Madrid. Si tratta di una terapia complementare perché mentre il paziente infetto continuerà ad essere trattato con la medicina allopatrica, allo stesso tempo il paziente riceverà il trattamento che questo documento propone.

**Almeno tre studi clinici con la Grande Autoemoterapia con Ozono sono attualmente in corso in Cina, ma sono necessari più studi clinici e dati per confermare l'efficacia dell'ozonoterapia come terapia complementare in COVID-19 malattie.**



## Parole chiave

Ozono, Ozonoterapia, COVID-19, SARS-CoV-2, Soluzione Salina Ozonizzata, Grande Autoemoterapia.

## Introduzione

I Coronavirus sono importanti patogeni umani e animali. Alla fine del 2019, un nuovo Coronavirus è stato identificato come la causa di un cluster di casi di polmonite a Wuhan (Hubei Provincia di Cina) e ha causato una grande epidemia globale che rappresenta un importante problema di salute pubblica.<sup>4</sup> Si è diffuso rapidamente, causando un'epidemia in tutta la Cina, con casi sporadici segnalati a livello globale. Nel febbraio 2020, l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha designato la malattia COVID-19, che sta per malattia da Coronavirus 2019.<sup>5</sup> Il virus che causa COVID-19 porta ad una sindrome respiratoria acuta grave Coronavirus 2 (SARS-CoV-2); in precedenza, era stato indicato come 2019-nCoV. SARS-CoV-2 è strettamente legato a due severi bat-derivati, sindrome simil-respiratoria Coronavirus, bat-SL-CoVZC45 e bat-SL-CoVZXC21, in particolare BetaCoV / bat / Yunnan / RaTG13 / 2013, sono simili all'essere umano. SARS -CoV-2. ha dimostrato di avere grande diversità genetica e rapida evoluzione.<sup>7</sup>

SARS-CoV-2 ha una gran trasmissione da uomo a uomo attraverso le goccioline respiratorie o per contatto diretto, l'infezione è stata valutata per avere un periodo di incubazione medio di 6,4 giorni e un numero riproduzione di base di 2.24 - 3.58 giorni.<sup>4</sup> Tra i pazienti con polmonite da SARS-CoV-2, la febbre è il sintomo più comune, seguita da tosse, malessere e tosse secca, nella fase prodromica.<sup>8</sup> L'interessamento polmonare bilaterale con l'opacità a vetro smerigliato è stata la constatazione più comune dalla tomografia computerizzata (TC) del torace. L'immagini TC hanno dimostrato progressione durante la fase iniziale di insorgenza della malattia.<sup>9</sup>

Al momento non ci sono farmaci antivirali con licenza da parte della Food and Drug Administration (FDA), dell'Agenzia spagnola del farmaco e salute (AEMPS) oppure da parte dell'Agenzia Italiana del Farmaco per i pazienti con COVID-19. A nostra conoscenza, fino ad ora non esistono farmaci antivirali autorizzati per trattare i pazienti con COVID-19 in qualsiasi paese del mondo. **Questo punto è stato confermato ufficialmente dall'OMS: “attualmente, non esistono vaccini o trattamenti farmaceutici specifici disponibili per COVID-19.”**<sup>1</sup> Alcuni studi *in-vitro* o *in vivo* suggeriscono la potenziale attività terapeutica di composti contro il Coronavirus, ma non ci sono dati disponibili provenienti da studi osservazionali o studi randomizzati controllati negli esseri umani che supportano la raccomandazione eventuale di terapie sperimentali per i pazienti con confermata o sospetta COVID-19.



Remdesivir, un farmaco antivirale sperimentale, è stato segnalato per avere attività *in vitro* contro-SARS-CoV-2.<sup>10</sup> Un piccolo numero di pazienti con COVID-19 ha ricevuto remdesivir per via endovenosa per uso compassionevole al di fuori di uno studio di sperimentazione clinica. Uno studio clinico randomizzato, controllato con placebo con remdesivir per il trattamento di pazienti ospedalizzati con polmonite e COVID-19 è stato implementato in Cina. Altri studi stanno testando lopinavir-ritonavir, duranavir, danoprevir, cobisistat randomizzato, anti-CD147 umanizzato, Meplazumab, Eculizumab, Bevacizumab, enzima di conversione dell'angiotensina 2 (rhACE2), le cellule NK, cordone ombelicale (UC) -Derived le cellule staminali mesenchimali (MSC), immunoglobuline, i regolatori del recettore sfingosina-1-fosfato, Fingolimod, idrossi-clorochina, vitamina C endovenosa, vitamina D, INF beta, glucocorticoidi, **grande autoemoterapia con ozono (questo è uno dei molti altri composti provati senza dati di successo disponibili ancora)**, rimedi tradizionali della medicina cinese e altri trattamenti sono stati anche stati condotti in pazienti ospedalizzati con polmonite e COVID-19 in Cina, ma i risultati non sono ad oggi disponibili. Sono previste sperimentazioni cliniche di altre terapie potenziali per COVID-19.<sup>11,12</sup>

Oltre alla diffusione virale attraverso la via respiratoria, SARS-CoV può essere escreto con le feci, le urine e il sudore, determinando così la trasmissione del virus.<sup>13</sup> L'enzima di conversione di angiotensina 2 (ACE2) molto probabilmente serve come sito di legame per SARS-CoV-2, il ceppo implicato nella epidemia corrente per COVID-19, analogamente al ceppo SARS-CoV implicato nella epidemia SARS 2002-2003.<sup>14</sup> Le principali comorbidity dei casi di mortalità comprendono ipertensione, diabete, malattia coronarica, infarto cerebrale, e bronchite cronica. La fonte del virus e la patogenesi di questa malattia non sono ancora confermate. Nessun farmaco terapeutico specifico è stato trovato.<sup>15</sup>

L'ozono terapia potrebbe essere utilizzata nel trattamento di COVID-19 attraverso due modalità:

- 1) Disinfezione (conta di un elevato supporto scientifico):
  - a) Gli ambienti contaminati (ospedali, trasporti, veicoli, tutte le superfici in cui il virus potrebbe essere stato depositato, ecc);
  - b) In soluzioni acquose quali disinfezioni di acqua potabile, il trattamento delle acque nere, lavanderia e alimenti.<sup>16</sup>
- 2) Applicazione sistemica potenziale come medicina complementare al fine di:
  - a) Migliorare lo stato di salute dei pazienti e ridurre la carica virale;<sup>17-19</sup>
  - b) Nella forma di collutorio acqua ozonizzata per ridurre l'incidenza di polmonite associata al ventilatore in pazienti collegati alla ventilazione meccanica.<sup>20</sup>

Lo scopo di questo lavoro è quello di individuare i potenziali meccanismi d'azione dell'ozono, che servirebbe come potenziale terapia complementare, nella gestione del COVID-19.

### **Termini utilizzati nella ricerca bibliografica:**

COVID-19, SARS-CoV-2, SARS, ozono, ozono terapia, polmonite virale.



Banche dati bibliografiche consultate: MEDLINE / PubMed, SciELO, lilla, OPS, EMBASE, Zotero ISCO3, OMS Clinical Trials Registry Platform internazionali, NIH. US National Library of Medicine e basi di dati informativi con i motori di ricerca come Google e Google Scholar.

Tipi di documenti: articoli originali, tesi pubblicate, rapporti clinici, studi clinici in corso e recensioni bibliografiche.

Lingue: inglese, russo e spagnolo. Date di pubblicazione: dal 1980 al 2020.

Criteri di esclusione: la mancanza di libero accesso al testo completo a causa di vincoli finanziari e / o studi, presentando prove scientifiche insufficienti.

### Disinfezione ambientale

Per ridurre la diffusione del COVID-19 virus, dovrebbero essere attuate le procedure di controllo delle infezioni ambientali.<sup>21-25</sup> Nelle impostazioni di assistenza sanitaria degli Stati Uniti, il CDC afferma che le procedure di pulizia e di disinfezione di routine sono appropriate per il COVID-19 virus.<sup>24</sup> Prodotti approvati negli Stati Uniti dalla *Environmental Protection Agency* (EPA) per uccidere patogeni virali, contengono come componenti attivi: perossido di idrogeno, ipoclorito di sodio, acido peracetico, etanolo, alcol isopropilico, alchil dimetil benzil ammonio cloruro, didecil dimetil ammonio cloruro, ottil decil dimetil ammonio cloruro, carbonato di sodio perossidrato, sodio dicloro-s-triazine-trione e altri.<sup>26</sup>

L'importanza della disinfezione ambientale è stata illustrata in uno studio di Singapore, in cui è stato rilevato l'RNA virale su quasi tutte le superfici testate (maniglie, interruttori, corrimano, porte interne e finestre, water, lavandino) nella stanza di isolamento di un paziente lievemente sintomatico al COVID-19 prima della pulizia di routine, probabilmente trasportate dall'aria.<sup>25</sup> L'RNA virale non è stato rilevato sulle superfici simili nelle stanze di altri due pazienti sintomatici, che però erano state sottoposte a pulizia di routine (con dicloroisocianurato di sodio). Da segnalare inoltre, che il rilevamento di RNA virale, non indica necessariamente la presenza del virus infettivo. Fattori che influenzano la sopravvivenza di questi virus sulle superfici includono: variazione del ceppo, titolo, tipo di superficie, mezzo sospeso, modalità di deposizione, temperatura e umidità relativa, e il metodo utilizzato per determinare la fattibilità del virus. Il campionamento ambientale ha individuato contaminazione delle superfici con SARS-CoV e virus influenzale, anche se l'uso frequente di metodi di rilevazione molecolari potrebbe non rappresentano necessariamente la presenza di virus vitale.

Una volta contaminate dall'ambiente, le mani possono avviare auto-inoculazione nelle membrane mucose del naso, degli occhi o della bocca. Modelli matematici e animali e studi di intervento suggeriscono che la trasmissione di contatto è il più importante percorso in alcuni scenari. La prevenzione ed il controllo delle infezioni, comprendono la necessità di igienizzare le mani e di usare dispositivi di protezione individuale contro l'inoculazione di superfici mucose



e del tratto respiratorio, per ridurre al minimo la contaminazione. Molto importante anche la pulizia delle superfici e la disinfezione degli ambienti sanitari.<sup>27</sup>

I virus sono stati studiati durante la loro interazione con l'ozono.<sup>28-31</sup> **Dopo 30 s di esposizione all'ozono, 99% dei virus sono stati inattivati** e hanno dimostrato danni alle loro proteine dell'involucro, cosa che potrebbe impedire al virus di attaccarsi alle cellule normali e provocargli la rottura del RNA a singolo filamento.<sup>28</sup> L'ozono gassoso presenta inoltre una serie di potenziali vantaggi rispetto ad altri gas decontaminanti e soluzioni chimiche liquide.<sup>32</sup> L'ozono è un composto naturale, è facilmente generato *in situ* dall'ossigeno, e poi si trasforma in ossigeno-ozono con un'emivita di circa 20 min ( $\pm$  10 min a seconda dell'ambiente).<sup>16</sup> Come gas può penetrare tutte le zone all'interno di una stanza, compreso fessure, infissi, tessuti, e sotto superfici di mobili, in maniera molto più efficace di applicazioni manuali di spray liquidi e aerosol.<sup>33</sup> Gli svantaggi solo significativi sono la sua capacità di corrodere alcuni materiali, come la gomma naturale, dopo un'esposizione prolungata, e la sua potenziale tossicità per gli esseri umani, se inalato.

L'Amministrazione sulla Sicurezza e la Salute del Lavoro (OSHA) negli Stati Uniti, ha stabilito per la sanità pubblica, Air Standard di 0,1 ppm per 8 ore o 0,3 ppm per 15 min come il limite della quantità di ozono a cui le persone possono essere esposte in modo sicuro.<sup>34</sup> I purificatori d'aria che utilizzano l'ozono non devono generare livelli di ozono al di sopra delle norme di sanità pubblica, che sono già ampiamente sufficienti per eliminare qualsiasi attività antimicrobica e i cattivi odori. A basse concentrazioni di ozono, al di sotto del limite di coperta EPA-accettabili, sono stati utilizzati come depuratori d'aria, ma la loro efficacia è stata messa in discussione da molti studi.<sup>35,36</sup> Ad alte concentrazioni, l'ozono è stato utilizzato per decontaminare **spazi non occupati da persone**, da contaminanti e odori chimici e biologici come il fumo.

Per avere una massima efficacia antivirale, l'ozono richiede un breve periodo di umidità elevata (> 90% di umidità relativa), dopo il raggiungimento della concentrazione di gas ozono (20 - 25 ppm, 39-49 mg / m<sup>3</sup>).<sup>16</sup> Uno studio ha mostrato che campioni di virus essiccati su superfici dure (plastica, acciaio e vetro), e superfici morbide (stoffa, cotone e moquette), erano ugualmente vulnerabili al trattamento con ozono.<sup>33</sup> Utilizzando i generatori adeguati e le concentrazioni di ozono appropriate, l'ozono contribuisce a decontaminare le stanze d'ospedale,<sup>37</sup> i mezzi di trasporto pubblico, le camere d'albergo, le cabine delle navi da crociera, gli uffici, ecc. **Gli ambienti che devono essere decontaminati, devono essere privi di persone e animali, a causa della natura tossica dell'ozono se inalato.**<sup>38</sup> In caso di inalazione accidentale, si raccomanda di seguire le misure proposte dall'ISCO3.<sup>39</sup> L'ozono viene anche utilizzato nella disinfezione della biancheria ospedaliera.<sup>40</sup> Inoltre, può essere utilizzato nel trattamento dei residui delle acque reflue.<sup>41</sup> I depuratori convenzionali riducono la quantità di tutti i virus, ma l'ozonizzazione riduce ulteriormente la quantità di diversi virus a livelli non rilevabili, il che indica che questa è una tecnica promettente per ridurre la trasmissione di molti virus umani patogeni.<sup>42</sup>



Le soluzioni acquose di ozono sono in uso come disinfettanti in molti casi, dal trattamento delle acque nere<sup>43</sup>, alle lavanderie,<sup>44</sup> all'acqua da bere<sup>45</sup> ed alla lavorazione degli alimenti.<sup>46,47</sup> L'ozono viene preso sempre più in considerazione come disinfettante altamente efficace per il controllo dei virus.<sup>48</sup> L'esposizione all'ozono riduce l'infettività virale mediante la perossidazione lipidica e al successivo danno all'involucro lipidico e proteico del virus.<sup>29</sup>

### Azioni terapeutiche di ozono nelle malattie virali

L'ozono può inattivare i virus mediante ossidazione diretta dei loro componenti.<sup>29</sup> Tuttavia l'attività virucida *in vivo* diventa incerta quando i virus sono in fluidi biologici o, peggio ancora, quando sono intracellulari (pneumociti, epatociti, epitelii, linfociti CD4 +, monociti, cellule gliali e neuroni), perché il nostro sistema antiossidante protegge l'integrità virale.<sup>49</sup> Ecco perché è irrazionale utilizzare iniezioni dirette di ozono o altri metodi di applicazione di ozono non consigliati.<sup>50</sup> L'ozono terapia aggiuntiva rappresenta un'utile terapia complementare ma né l'ozono, né l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> raggiungono concentrazioni sufficienti nei tessuti, perché patogeni liberi sono protetti da antiossidanti plasmatici e i virus intracellulari sono inaccessibili.<sup>51</sup> Tuttavia, al fine di esplorare l'efficacia dell'ozonoterapia nelle malattie virali, Bocci e Paulesu<sup>52</sup> spiegano la possibilità che l'ozono può agire *in vivo*. I seguenti meccanismi possono avere una certa rilevanza:

- a) *Un trattamento terapeutico prolungato con ozono sembra in grado di indurre un adattamento allo stress ossidativo*, quindi un riequilibrio dello stato redox cellulare, che è un processo fondamentale per inibire la replicazione virale che verrà bloccato. Il meccanismo mediante il quale paradossalmente l'ozono (un potente ossidante) può indurre una risposta antiossidante, è attualmente dimostrato non solo a livello proteomico, ma anche a livello genomico. L'ozono a dose terapeutica modula il fattore nucleare Nrf2 e NF-KB e induce il riequilibrio dell'ambiente antiossidante.<sup>53-58</sup> Lo stress ossidativo e l'immunità innata hanno un ruolo chiave nei percorsi di danno polmonare che controllano la gravità del danno polmonare acuto durante le infezioni virali come la SARS.<sup>59</sup>
- b) *L'induzione di sintesi di citochine, quali IFN e IL*, nel sangue ozonizzato ha dimostrato di essere possibile. Sebbene l'ozono sia un induttore debole, i linfociti e monociti reinfusi, migrando attraverso il sistema linfatico, possono attivare altre cellule che, nel tempo, porteranno ad una stimolazione del sistema immunitario. Questo può rappresentare un processo importante, perché è noto che una malattia virale acuta diventa cronica o perché il virus è particolarmente virulento, o perché l'eterogenea popolazione virale evolve rapidamente e sfugge al controllo immunitario, o perché il sistema immunitario diventa tollerante agli antigeni virali e diventa incapace di contrastare l'infezione. Inoltre, oltre all'induzione di HO-1,<sup>58</sup> un enzima protettivo, il rilascio di alcune proteine da shock termico (HSP) come la HSP60, la HSP70 e la HSP90, presentano anche importante attività virucida. Queste proteine sono potenti attivatori del sistema immunitario, in grado di indurre la sintesi di citochine



proinfiammatorie dal sistema monociti-macrofagi e l'attivazione delle cellule presentanti l'antigene.<sup>49,60</sup>

- c) *L'ossigeno-ozono terapia migliora sicuramente l'ossigenazione.*<sup>61,62</sup> I pazienti con SARS sono inclini ad avere lieve epatite non specifica,<sup>63</sup> fibrosi polmonare<sup>64</sup> e possono sviluppare anche insufficienza renale.<sup>65</sup> L'ozonoterapia stabilizza il metabolismo epatico ed il fibrinogeno ed i livelli plasmatici di protrombina tendono a normalizzarsi in pazienti infetti, suggerendo un miglioramento della sintesi proteica epatica.<sup>49</sup> Ci sono moltissime ricerche scientifiche che dimostrano l'effetto protettivo dell'ozono, al fine di prevenire il danno ossidativo al cuore,<sup>66,67</sup> fegato,<sup>68,69</sup> polmone<sup>70</sup> e tessuto renale.<sup>71</sup>
- d) Durante l'ozonizzazione del sangue *ex vivo* attraverso la piccola autoemo, con concentrazioni di ozono vicino 90 µg / mL per mL di sangue, può essere possibile indurre l'ossidazione dei componenti virali liberi, che potrebbero rappresentare un vaccino inattivato e immunogenico.<sup>49,72,73</sup>
- e) *Soluzione Salina Ozonizzata.* Questo metodo è stato formalizzato dal Ministero della Salute della Federazione Russa nei primi anni '80 ed è stato ufficialmente implementato negli ospedali di salute pubblica, in particolare per le specialità di ortopedia, dermatologia, ginecologia e ostetricia.<sup>74,75</sup> Nel 2004, è stato anche riconosciuto ufficialmente in Ucraina.<sup>76</sup> Il metodo è supportato da una grande quantità di articoli scientifici e da una forte esperienza clinica circa i benefici di questa terapia.<sup>77</sup>

Il metodo consiste nel far gorgogliare con la miscela ossigeno-ozono, con concentrazioni che vengono calcolate a seconda del peso del paziente, fino a saturazione, una soluzione fisiologica (0,9%). La sua infusione richiede circa 20-30 min. A differenza della grande autoemoterapia, la soluzione salina ozonizzata ha dimostrato di essere particolarmente efficace nelle malattie virali come Epstein Barr, citomegalovirus, Papillomavirus, HIV, Herpes zoster, Herpes Simplex, ecc. Poiché la soluzione salina è un espansore del plasma, O<sub>3</sub>SS consente di trattare una quantità maggiore di sangue, rispetto alla MAH e quindi il numero di sessioni per avere un effetto terapeutico può essere inferiore.

L'analisi dei dati bibliografici sull'interazione di ozono con NaCl in soluzioni acquose, permette di concludere che la decomposizione dell'ozono in soluzioni acquose di NaCl non è accompagnata dalla formazione di prodotti diversi dall'ossigeno. In particolare, non è stata osservata alcuna quantità eccessiva di ipocloriti e clorati. Ciò è particolarmente significativo per le applicazioni terapeutiche di soluzioni isotoniche ozonizzate.<sup>78,79</sup>

Quando l'ozono si dissolve nell'acqua, si formano radicali liberi, perossido di idrogeno (in una quantità insignificante!), strutture esagonali di acqua e piccole molecole. Le molecole di acqua esagonali che si formano durante l'ozonizzazione di soluzioni



acquose, migliora il trasporto attraverso la membrana cellulare non solo di elettroliti, ma possibilmente anche di altre sostanze.<sup>80</sup>

Boyarinov GA e Sokolov VV<sup>81,82</sup> hanno dimostrato che quando viene eseguito un bypass cardiopolmonare ozonizzato (cardiopolmonare extracorporea), le cellule dell'organismo del paziente utilizzano più glucosio rispetto a quando è ossigenato. Pertanto, possiamo concludere che la miscela disciolta di O<sub>2</sub>/O<sub>3</sub>, i radicali liberi, il perossido di idrogeno e le strutture esagonali acquose formatesi durante il gorgogliamento di soluzioni acquose di NaCl con una miscela di gas O<sub>2</sub>/O<sub>3</sub>, determinano l'effetto terapeutico della soluzione fisiologica ozonizzata.

La procedura non solo è efficace e sicura, ma è molto più economica e più facile da implementare.

### **Via di somministrazione consigliate**

Le vie di somministrazione raccomandate sono le sistemiche e in quest'ordine: Soluzione Salina Ozonizzata (O<sub>3</sub>SS), Grande Autoemoterapia (MAH), Ossigenazione-Ozonizzazione Extracorporea del Sangue (EBOO) e una variante della Piccola Autoemoterapia (MAH) (utilizzando 90 µg / NmL). La sintesi della procedura di somministrazione di ogni metodica è descritta nella Dichiarazione di Madrid sulla Ozono Terapia.<sup>74</sup> Inoltre, la procedura passo per passo è disponibile in forma scritta, secondo la buona pratica clinica per condurre ciascuna procedura e può essere scaricata dal sito web ISCO3 ([www.isoc3.org](http://www.isoc3.org)).<sup>83-85</sup>

### **Protocollo clinico raccomandata con O<sub>3</sub>SS**

Queste raccomandazioni si basano sull'esperienza clinica dell'ozonoterapeuta e devono essere sottoposte ad ulteriori test clinici. Nota che attualmente ci sono tre studi clinici in Cina, ma i risultati preliminari non sono ancora disponibili.<sup>17-19</sup>

#### *Protocollo preventivo con O<sub>3</sub>SS*

Saturazione della soluzione salina fisiologica 0,9% a 3 µg / NmL per 10 min. Somministrare al paziente sotto gorgogliamento con gli stessi parametri a 80/120 gocce / min. Due volte alla settimana per 6 trattamenti. Dopo la somministrazione del O<sub>3</sub>SS, somministrare glutazione (GSH) iv 600 mg + Vit. C 1 g sciolti in 100 mL di soluzione fisiologica. Due volte alla settimana per 6 trattamenti.

#### *Protocollo interventistico con O<sub>3</sub>SS*

Saturazione della soluzione salina fisiologica 0,9% a 5 µg / NmL per 10 min. Somministrare al paziente sotto gorgogliamento con gli stessi parametri a 80/120 gocce / min. Ogni giorno, per 5 giorni. I successivi 5 giorni abbassare la concentrazione di 3 mg / NmL. 10 trattamenti in



totale. Dopo ogni O<sub>3</sub>SS, somministrare iv GSH 1,2 g + Vit. C 2 g. sciolti in 100 mL di soluzione fisiologica. Effettuare 10 trattamenti, due volte a settimana.

Poiché la malattia induce uno stress ossidativo acuto, includiamo GSH, per la sua capacità di donare elettroni e stabilizzare i radicali liberi generati dal virus. GSH è un antiossidante non enzimatico, ed è una delle prime linee di difesa contro il danno ossidativo. Durante l'invecchiamento, il livello di GSH si riduce ed il sistema immunitario va incontro ad una deficienza dell'induzione della risposta Th1. Questo comporta una riduzione della secrezione di citochine Th1, che, associata alla deplezione di GSH, potrebbe indebolire le difese dell'ospite contro le infezioni virali.<sup>86</sup>

### *Dispositivi (Generatori di ozono e monouso)*

L'ozono deve essere prodotto da un generatore medico affidabile e certificato. I generatori di ozono sono dispositivi medici classificati in seno all'Unione europea, come dispositivo di classe IIb<sup>87</sup> e debbono avere il marchio CE, accompagnato da quattro numeri (art. 9 della direttiva 93/42 / CEE, conformemente all'allegato IX della stessa direttiva). Il generatore deve consentire la misura precisa delle concentrazioni di ozono (da 1 µg / NmL - 80 µg / NmL) e produrre ozono esclusivamente dall'ossigeno medicale proveniente da un contenitore di certificata qualità medica.

L'apparecchiatura deve avere la possibilità di regolare il flusso di uscita tra 200-500 mL / min e dev'essere in grado di gestire il flusso continuo a concentrazioni molto basse (2-5 µg / NmL).

Il materiale monouso per somministrare la terapia deve essere privo di ftalati e resistente all'ozono. Essi dovrebbero avere la stessa classificazione del generatore di ozono, (dispositivo medico).

### **Osservazioni conclusive**

L'ozono può essere utile per la disinfezione, la sua massima efficacia antivirale richiede un breve periodo di umidità elevata (> 90% di umidità relativa), dopo il raggiungimento di un picco della concentrazione di ozono (20 - 25 ppm, 39-49 mg / m<sup>3</sup>). In ogni caso, gli spazi devono essere privi di persone a causa della tossicità dell'ozono per la via inalatoria. L'ambiente da trattare deve essere privo di persone e animali a causa della relativa tossicità dell'ozono se inalato.

L'ozono terapia sistemica può essere potenzialmente utile in SARS-CoV-2. Il razionale ed il meccanismo di azione sono già stati dimostrati clinicamente con altre infezioni virali ed hanno dimostrato di essere altamente efficaci negli studi di ricerca. I meccanismi d'azione sono i seguenti:

- 1) Induzione di adattamento allo stress ossidativo, quindi un riequilibrio dello stato redox cellulare.
- 2) Induzione di IFN-gamma e citochine proinfiammatorie.
- 3) Aumento del flusso



sanguigno e ossigenazione dei tessuti di organi vitali (cioè renale, polmonare e circolazione cardiaca). 4) Ha il potenziale di agire come un auto-vaccino quando somministrato in forma di minore autoemoterapia.

La somministrazione sistemica consigliata è: Soluzione Salina Ozonizzato (O<sub>3</sub>SS), Grande Autoemoterapia (MAH), e Ossigenazione-Ozonizzazione Extracorporea del Sangue (EBOO). I protocolli clinici dovrebbero rispettare le dosi e le procedure standard definite nella Dichiarazione di Ozonoterapia di Madrid.<sup>71</sup> Almeno tre studi clinici con la Grande Autoemoterapia sono in corso in Cina e sono necessari più studi clinici per confermare l'efficacia dell'Ozonoterapia come terapia complementare nel trattamento del COVID-19. È una terapia complementare perché mentre il paziente infetto viene trattato con la medicina allopatrica, allo stesso tempo il paziente può essere trattato con il trattamento complementare proposto.

## Riferimenti

1. WHO. Responding to community spread of COVID-19 Interim guidance 7 March 2020. WHO file:///C:/Users/USER-PC/Downloads/WHO-COVID-19-Community\_Transmission-2020.1-eng.pdf) (Accessed on 12/03/2020)2020.
2. Ghebreyesus T. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020. <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020> (Accessed on 12/03/2020)2020.
3. Ghebreyesus T. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 12 March 2020. <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-mission-briefing-on-covid-19---12-march-2020> (Accesses on 12/03/2020)2020.
4. Lai CC, Shih TP, Ko WC, Tang HJ, Hsueh PR. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges. *Int J Antimicrob Agents*. Feb 17 2020;105924.
5. WHO. World Health Organization. Director-General's remarks at the media briefing on 2019-nCoV on 11 February 2020. <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-remarks-at-the-media-briefing-on-2019-ncov-on-11-february-2020> (Accessed on March 3, 2020). 2020.
6. Li X, Zai J, Zhao Q, et al. Evolutionary history, potential intermediate animal host, and cross-species analyses of SARS-CoV-2. *J Med Virol*. Feb 27 2020.
7. Phan T. Genetic diversity and evolution of SARS-CoV-2. *Infect Genet Evol*. Feb 21 2020;81:104260.
8. Habibzadeh P, Stoneman EK. The Novel Coronavirus: A Bird's Eye View. *Int J Occup Environ Med*. Feb 5 2020;11(2):65-71.
9. Xiong Y, Sun D, Liu Y, et al. Clinical and High-Resolution CT Features of the COVID-19 Infection: Comparison of the Initial and Follow-up Changes. *Invest Radiol*. Mar 3 2020.
10. Wang M, Cao R, Zhang L, et al. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Res*. Mar 2020;30(3):269-271.
11. WHO. World Health Organization. International Clinical Trials Registry Platform. <http://apps.who.int/trialsearch/> [Accessed on 07/03/2020]. 2020.
12. NIH. U.S. National Library of Medicine. Clinical Trials.gov <https://www.clinicaltrials.gov/> [Accessed on 07/03/2020]. 2020.
13. Ding Y, He L, Zhang Q, et al. Organ distribution of severe acute respiratory syndrome (SARS) associated coronavirus (SARS-CoV) in SARS patients: implications for pathogenesis and virus transmission pathways. *J Pathol*. Jun 2004;203(2):622-630.
14. Gurwitz D. Angiotensin receptor blockers as tentative SARS-CoV-2 therapeutics. *Drug Dev Res*. Mar 4 2020.
15. Deng SQ, Peng HJ. Characteristics of and Public Health Responses to the Coronavirus Disease 2019 Outbreak in China. *J Clin Med*. Feb 20 2020;9(2).
16. Hudson JB, Sharma M, Vimalanathan S. Development of a Practical Method for Using Ozone Gas as a Virus Decontaminating Agent. *Ozone: Science & Engineering*. 2009;31:216-223.
17. Guangjian N, Hongzhi Y. Clinical study for ozonated autohemotherapy in the treatment of Novel Coronavirus Pneumonia (COVID-19). ChiCTR2000030165. Academy of Medical Engineering and Translational Medicine, Tianjin University. 2020-02-24. <http://www.chictr.org.cn/showproj.aspx?proj=49947> (Accessed 8/03/2020). . 2020.



18. Linlin H, Xiangdong C. A randomized controlled trial for the efficacy of ozonated autohemotherapy in the treatment of Novel Coronavirus Pneumonia (COVID-19). ChiCTR2000030006. Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology. 2020-02-19. <http://www.chictr.org.cn/showproj.aspx?proj=49737> (Accessed 8/03/2020). . 2020.
19. Huiling H, Tong X. A multicenter randomized controlled trial for ozone autohemotherapy in the treatment of novel coronavirus pneumonia (COVID-19). ChiCTR2000030102. Tianjin Huanhu Hospita. 2020-02-23. <http://www.chictr.org.cn/showproj.aspx?proj=49747> (Accessed 8/03/2020). 2020.
20. Soodmand M. A survey of the effect of ozonated water mouthwash on oral health and incidence of ventilator-associated pneumonia in patients connected to mechanical ventilation in intensive care units - A randomized clinical trial. IRCT20180213038720N2. Registration date: 2019-12-18, 1398/09/27 <https://en.ircct.ir/trial/41951> (Accessed 8/03/2020). . 2019.
21. WHO. World Health Organization. Home care for patients with suspected novel coronavirus (nCoV) infection presenting with mild symptoms and management of contacts. Updated February 4, 2020. [https://www.who.int/publications-detail/home-care-for-patients-with-suspected-novel-coronavirus-\(ncov\)-infection-presenting-with-mild-symptoms-and-management-of-contacts](https://www.who.int/publications-detail/home-care-for-patients-with-suspected-novel-coronavirus-(ncov)-infection-presenting-with-mild-symptoms-and-management-of-contacts) (Accessed on March 8, 2020). 2020.
22. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Interim guidance for persons who may have 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV) to prevent spread in homes and residential communities. [https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/guidance-prevent-spread.html#First\\_heading](https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/guidance-prevent-spread.html#First_heading) (Accessed on March 08, 2020). 2020.
23. WHO. World Health Organization. Infection prevention and control during health care when novel coronavirus (nCoV) infection is suspected. January 25, 2020. [https://www.who.int/publications-detail/infection-prevention-and-control-during-health-care-when-novel-coronavirus-\(ncov\)-infection-is-suspected-20200125](https://www.who.int/publications-detail/infection-prevention-and-control-during-health-care-when-novel-coronavirus-(ncov)-infection-is-suspected-20200125) (Accessed on March 08, 2020). 2020.
24. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Interim Infection Prevention and Control Recommendations for Patients with Confirmed 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV) or Patients Under Investigation for 2019-nCoV in Healthcare Settings. February 3, 2020. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/hcp/infection-control.html> (Accessed on March 08, 2020). 2020.
25. Ong SWX, Tan YK, Chia PY, et al. Air, Surface Environmental, and Personal Protective Equipment Contamination by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) From a Symptomatic Patient. *JAMA*. Mar 4 2020.
26. EPA. United States Environmental Protection Agency. EPA's Registered Antimicrobial Products for Use Against Novel Coronavirus SARS-CoV-2, the Cause of COVID-19. 03/03/2020. <https://www.epa.gov/pesticide-registration/list-n-disinfectants-use-against-sars-cov-2> (Accessed 8/03/2020). 2020.
27. Otter JA, Donskey C, Yezli S, Douthwaite S, Goldenberg SD, Weber DJ. Transmission of SARS and MERS coronaviruses and influenza virus in healthcare settings: the possible role of dry surface contamination. *J Hosp Infect*. Mar 2016;92(3):235-250.
28. Roy D, Wong PK, Engelbrecht RS, Chian ES. Mechanism of enteroviral inactivation by ozone. *Appl Environ Microbiol*. Mar 1981;41(3):718-723.
29. Murray BK, Ohmine S, Tomer DP, et al. Virion disruption by ozone-mediated reactive oxygen species. *J Virol Methods*. Oct 2008;153(1):74-77.
30. Lin YC, Wu SC. Effects of ozone exposure on inactivation of intra- and extracellular enterovirus 71. *Antiviral Res*. Jul 2006;70(3):147-153.
31. Kekez MM, Sattar SA. A new ozone-based method for virus inactivation: preliminary study. *Phys Med Biol*. Nov 1997;42(11):2027-2039.
32. Barker J, Vipond IB, Bloomfield SF. Effects of cleaning and disinfection in reducing the spread of Norovirus contamination via environmental surfaces. *J Hosp Infect*. Sep 2004;58(1):42-49.
33. Hudson JB, Sharma M, Petric M. Inactivation of Norovirus by ozone gas in conditions relevant to healthcare. *J Hosp Infect*. May 2007;66(1):40-45.
34. OSHA. Occupational Safety and Health Administration. Occupational Safety and Health Standards. Toxic and Hazardous Substances. 1910.1000 TABLE Z-1 Limits for Air Contaminants. <https://www.osha.gov/laws-regs/regulations/standardnumber/1910/1910.1000TABLEZ1> (Accessed 8/03/2020). 2020.
35. Dyas A, Boughton BJ, Das BC. Ozone killing action against bacterial and fungal species; microbiological testing of a domestic ozone generator. *J Clin Pathol*. Oct 1983;36(10):1102-1104.
36. Foarde KK, VanOsdell DW, Steiber RS. Investigation of Gas-Phase Ozone as a Potential Biocide. *Applied Occupational and Environmental Hygiene* 1997;12(8):535-542.
37. Lemon SM. SARS: Clearing the air. In: Knobler S, Mahmoud A, Lemon S, Mack A, Sivitz L, Oberholtzer K, eds. *Learning from SARS: Preparing for the Next Disease Outbreak: Workshop Summary*. Washington (DC): National Academies Press; 2004:376.
38. Bocci V, Borrelli E, Travagli V, Zanardi I. The ozone paradox: ozone is a strong oxidant as well as a medical drug. *Med Res Rev*. Jul 2009;29(4):646-682.



39. ISCO3. First Aids in Ozone Therapy. (Inhalatory exposition and accidental over dose). 2015; 16. Available at: [www.isco3.org](http://www.isco3.org). Accessed March 8, 2020.
40. Cardoso CC, Fiorini JE, Ferriera LR, Gurjao JW, Amaral LA. Disinfection of hospital laundry using ozone: microbiological evaluation. *Infect Control Hosp Epidemiol*. Apr 2000;21(4):248.
41. Wang J, Shih Y, Wang PY, Yu YH, Su JF, Huang CP. Hazardous waste treatment technologies. *Water Environ Res*. Oct 2019;91(10):1177-1198.
42. Wang H, Sikora P, Rutgersson C, et al. Differential removal of human pathogenic viruses from sewage by conventional and ozone treatments. *Int J Hyg Environ Health*. Apr 2018;221(3):479-488.
43. Gottschalk C, Libra JA, Saupé A. *Ozonation of Water and Waste Water: A Practical Guide to Understanding Ozone and its Application*: ohn Wiley & Sons; 2008.
44. Cardis D, Tapp C, DeBrum M, Rice RG. Ozone in the Laundry Industry-Practical Experiences in the United Kingdom. *Ozone: Sci. Eng*. 2007;29:85-89.
45. Shin GA, Sobsey MD. Reduction of Norwalk virus, poliovirus 1, and bacteriophage MS2 by ozone disinfection of water. *Appl Environ Microbiol*. Jul 2003;69(7):3975-3978.
46. Kim JG, Yousef AE, Dave S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. *J Food Prot*. Sep 1999;62(9):1071-1087.
47. Naito S, Takahara H. Ozone Contribution in Food Industry in Japan. *Ozone Sci. Eng*. 2006;28:425-429.
48. Wolf C, von Gunten U, Kohn T. Kinetics of Inactivation of Waterborne Enteric Viruses by Ozone. *Environ Sci Technol*. Feb 20 2018;52(4):2170-2177.
49. Bocci V. *Ozone: A new medical drug*. Netherlands: Springer; 2011.
50. ISCO3. Non-recommended routes of application in ozone therapy ISCO3/LEG/00/10. 2017:13. [www.isco3.org](http://www.isco3.org).
51. Burgassi S, Zanardi I, Travagli V, Montomoli E, Bocci V. How much ozone bactericidal activity is compromised by plasma components? *J Appl Microbiol*. May 2009;106(5):1715-1721.
52. Bocci V, Paulesu L. Studies on the biological effects of ozone 1. Induction of interferon gamma on human leucocytes. *Haematologica*. Nov-Dec 1990;75(6):510-515.
53. Martinez-Sanchez G. Mechanisms of action of O3. Genomic pathways. *Ozone Therapy Global Journal*. 2019 2019;9(1):21-22.
54. Delgado-Roche L, Riera-Romo M, Mesta F, Hernández-Matos Y, Barrios JM, Martínez-Sánchez G. Medical Ozone Promotes Nrf2 Phosphorylation Reducing Oxidative Stress And Proinflammatory Cytokines In Multiple Sclerosis Patients. *Rev Esp Ozonoterapia*. 2018 2018;8(2 Supp 1):48-49.
55. Martinez-Sanchez G, Delgado-Roche L. Up-date on the mechanisms of action of ozone through the modification of cellular signaling pathways. Role of Nrf2 and NFkb. *Rev Esp Ozonoterapia*. 2017 2017;7(2):17-18.
56. Bocci V, Valacchi G. Nrf2 activation as target to implement therapeutic treatments. *Front Chem*. 2015;3:4.
57. Re L, Martinez-Sanchez G, Bordicchia M, et al. Is ozone pre-conditioning effect linked to Nrf2/EpRE activation pathway in vivo? A preliminary result. *Eur J Pharmacol*. Nov 5 2014;742:158-162.
58. Pecorelli A, Bocci V, Acquaviva A, et al. NRF2 activation is involved in ozonated human serum upregulation of HO-1 in endothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. Feb 15 2013;267(1):30-40.
59. Imai Y, Kuba K, Neely GG, et al. Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury. *Cell*. Apr 18 2008;133(2):235-249.
60. Larini A, Bocci V. Effects of ozone on isolated peripheral blood mononuclear cells. *Toxicol In Vitro*. Feb 2005;19(1):55-61.
61. Lintas G, Liboni W, Simonetti V, et al. Long-term cerebrovascular reactivity mediated by ozone autohemotherapy: a NIRS study. Paper presented at: Terzo Congresso del Gruppo Nazionale di Bioingegneria; 2012, 2012.
62. Zaky S, Fouad EA, Kotb HIM. The effect of rectal ozone on the portal vein oxygenation and pharmacokinetics of propranolol in liver cirrhosis (a preliminary human study). *British Journal of Clinical Pharmacology*. Mar 2011 2011;71(3):411-415.
63. Guan YJ, Tang XP, Yin CB, Yi ZQ. [Study on the damage of liver in patients with SARS]. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. May 2004;16(5):267-270.
64. Venkataraman T, Frieman MB. The role of epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in SARS coronavirus-induced pulmonary fibrosis. *Antiviral Res*. Jul 2017;143:142-150.
65. Khan G. A novel coronavirus capable of lethal human infections: an emerging picture. *Virology*. Feb 28 2013;10:66.
66. Simonetti V, Quagliariello V, Franzini M, Iaffaioli RV, Maurea N, Valdenassi L. Ozone Exerts Cytoprotective and Anti-Inflammatory Effects in Cardiomyocytes and Skin Fibroblasts after Incubation with Doxorubicin. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2019;2019:2169103.
67. Delgado-Roche L, Hernandez-Matos Y, Medina EA, Morejon DA, Gonzalez MR, Martinez-Sanchez G. Ozone-Oxidative Preconditioning Prevents Doxorubicin-induced Cardiotoxicity in Sprague-Dawley Rats. *Sultan Qaboos Univ Med J*. Aug 2014;14(3):e342-348.



68. Adali Y, Eroglu HA, Makav M, Guvendi GF. Efficacy of Ozone and Selenium Therapy for Alcoholic Liver Injury: An Experimental Model. *In Vivo*. May-Jun 2019;33(3):763-769.
69. Tezcan AH, Ozturk O, Ustebay S, Adali Y, Yagmurdu H. The beneficial effects of ozone therapy in acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Pharmacol Rep*. Apr 2018;70(2):340-345.
70. Kaldirim U, Uysal B, Yuksel R, et al. Ozone therapy ameliorates paraquat-induced lung injury in rats. *Exp Biol Med (Maywood)*. Dec 2014;239(12):1699-1704.
71. Wang L, Chen H, Liu XH, et al. Ozone oxidative preconditioning inhibits renal fibrosis induced by ischemia and reperfusion injury in rats. *Exp Ther Med*. Dec 2014;8(6):1764-1768.
72. Bocci V, Zanardi I, Travagli V. Ozonation of human HIV-infected plasmas for producing a global vaccine: How HIV-patients may help fight the HIV pandemia. *Virulence*. May-Jun 2010;1(3):215-217.
73. Bocci V, Travagli V, Zanardi I. The failure of HIV vaccines: a new autovaccine may overcome some problems. *Medical Hypotheses*. Jun 2009 2009;72(6):662-664.
74. Schwartz-Tapia A, Martínez-Sánchez G, Sabah F, et al. Madrid Declaration on Ozone Therapy. . *ISCO3*. 2015:50.
75. Peretiagn SP, Struchkov AA, eretiagn NC, Kulechina NB, Inventors; 2289413, assignee. Ozonization Method of Saline Solution 2006.
76. Shmakova IP, Nazarov EI. Methods of application of ozone in medicine (guidelines). 2004.
77. Maslennikov OV, Kontorshikova CN, Gribkova IA. *Ozone therapy in Practice. Health Manual, Ministry Health Service of The Russian Federation The State Medical Academy Of Nizhny Novgorod, Russia.* [http://www.absoluteozone.com/assets/ozone\\_therapy\\_in\\_practice.pdf](http://www.absoluteozone.com/assets/ozone_therapy_in_practice.pdf). 1 ed 2008.
78. Razumovskii SD, Konstantinova ML, Grinevich TV, Korovina GV, Zaitsev VY. Mechanism and kinetics of the reaction of ozone with sodium chloride in aqueous solutions. *Kinetics and Catalysis*. 2010;51(4):492-496.
79. Boyarinov GA, Gordetsov AS, Peretyagin SP, Matusyak KS, Ovchinnikov YV, Boyarionova LV. The analysis of interaction of ozone and sodium chloride in Aqueous solution. *Rev Esp de Ozonoterapia*. 2016;6(Supp 1):77.
80. Gorbunov SN, Korhouknov AE, Mozhaev MV, et al. [Structural-molecular transformations of water solutions of electrolytes under the influence of medical ozone]. *Meditsinskii almanakh*. 2013 2013(3):38-40.
81. Boyarinov GA, Sokolov VV. *Ozonized cardiopulmonary bypass (experimental justification and clinical results)*. Nizhny Novgorod, 1999.
82. Boyarinov GA, Monakhov AN, Medvedev AP, Chiginev VA, Beaver VM, Gamzaev AB. *The effect of the ozonized cardioplegic solution on cardiodynamics during cardiac valve prostheses // In the book: Ozone in biology and medicine: Abstract. Doc. II Vseros. Scientific and practical confer. with international participation Nizhny Novgorod*. Nizhny Novgorod 1995.
83. ISCO3 I. ISCO3/MET/00/01 Major Autohemotherapy (AHTmayor).
84. ISCO3. ISCO3/MET/00/02 Minor Autohemotherapy. [www.isco3.org2016](http://www.isco3.org2016).
85. ISCO3. Extracorporeal blood oxygenation-ozonation (EBOO) *ISCO3/MET/00/22*. 2016;1:9.
86. Amatore D, Celestino I, Brundu S, et al. Glutathione increase by the n-butanoyl glutathione derivative (GSH-C4) inhibits viral replication and induces a predominant Th1 immune profile in old mice infected with influenza virus. *FASEB Bioadv*. May 2019;1(5):296-305.
87. ISCO3. Guidelines and Recommendations for Medical Professionals Planning to Acquire a Medical Ozone Generator. *International Scientific Committee of Ozone Therapy* [www.isco3.org](http://www.isco3.org) 2019. Accessed 11/03, 2020.