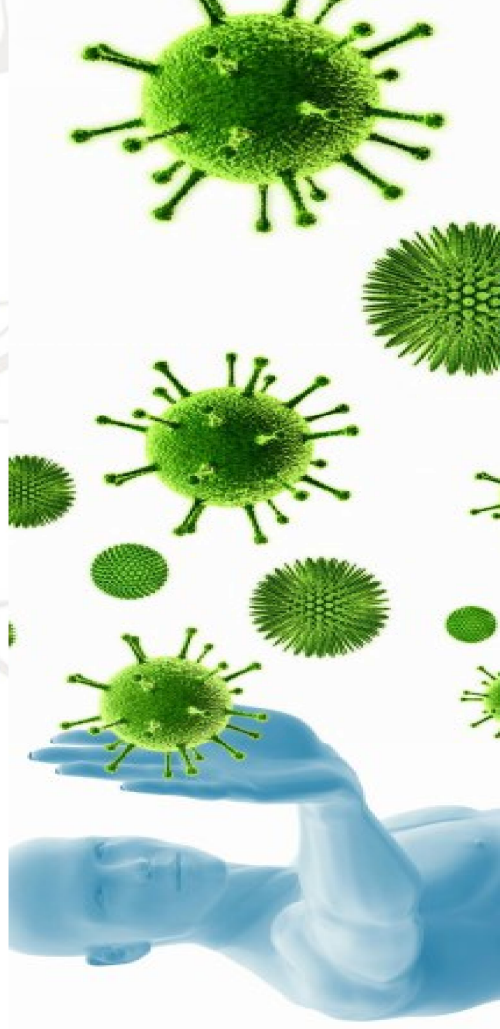


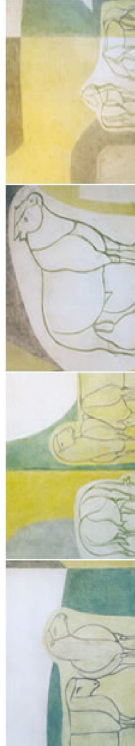


# Disinfezione e sterilizzazione



Francesca Rosone

D.O. Diagnosi Malattie Virali e delle Leptosirosi



# Controllo biologico dei microrganismi

## 1) Pulizia

## 2) Disinfezione

- metodi chimici
- metodi fisici

## 3) Sterilizzazione

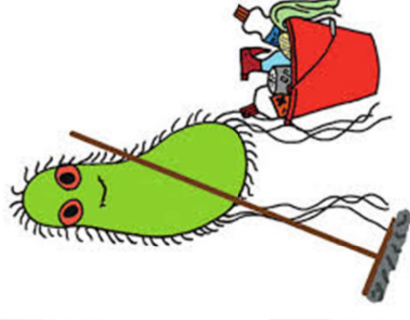
- metodi fisici
- metodi chimici
- metodi chimico-fisici



# Controllo biologico dei microrganismi

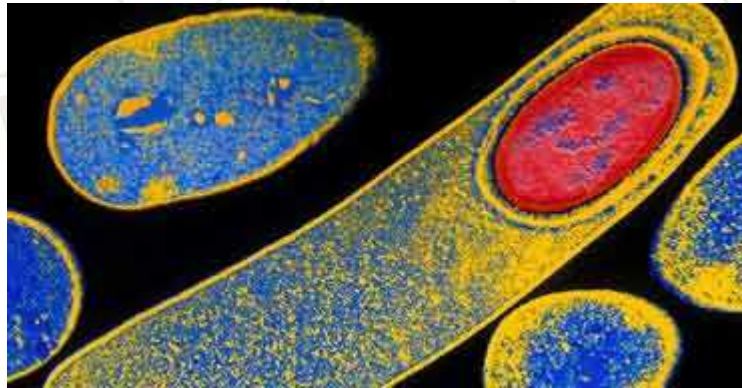
**PULIZIA** = rimozione di materiale organico dalla strumentazione e dalle attrezzature

1. sciacquare l'oggetto con acqua fredda
2. applicare il detergente e rimuovere meccanicamente il materiale organico
3. risciacquare l'oggetto con acqua tiepida
4. asciugare l'oggetto, quindi disinfettare / sterilizzare



# Controllo biologico dei microrganismi

**DISINFEZIONE** = processo che riduce od elimina completamente tutti i microrganismi patogeni allo stato vegetativo. Non è attiva nei confronti delle spore.



**ANTISEPSI**=applicazione topica a mucose, cute od altri tessuti





# Are they dead or not ?

## Definizioni

**Biocida:** composto che inattiva tutti i microrganismi viventi (patogeni e non-) incluse le spore

- battericida, fungicida, virucida, sporicida

**Biostatico:** composto che impedisce la crescita dei microrganismi, non necessariamente inattivandoli

- batteriostatico, fungistatico, virustatico

**Sepsi:** contaminazione microbica

**Asepsi:** assenza di contaminazione microbica



# Controllo biologico dei microrganismi

**STERILIZZAZIONE**= impiego di procedure chimiche, fisiche e/o chimico-fisiche per la completa eliminazione o inattivazione di qualsiasi forma di vita microbica, incluse le spore batteriche (forme di resistenza).

- Concetto assoluto, sebbene influenzato dalla capacità tecnica di rimuovere/inattivare i microrganismi:

*ad esempio, una soluzione filtrata non è tecnicamente sterile, poiché non in grado di rimuovere la componente virale causa le esigue dimensioni*



# Decision-making nei processi di disinfezione/sterilizzazione



- substrato / ambiente in cui si opera
- microrganismi che è possibile trovare nel l'ambiente e loro interazione con l'uomo
- cariche microbiche attese
- interazione tra microorganismi e disinfettanti
- eventuali residui di disinfettante e loro tossicità
- durata del trattamento, temperatura e concentrazione del disinfettante



# DISINFEZIONE

Può essere ottenuta mediante:

- **Agenti fisici:**
  - Calore umido
- **Agenti chimici:**
  - ossidanti (acqua ossigenata)
  - alogeni (cloro, iodio)
  - alcoli (etilico, isopropilico)
  - aldeidi (formica, glutarica)
  - fenoli
  - sali quaternari d'ammonio
  - composti del cloro

TABLE 10-2

**Methods of Disinfection**

METHOD	CONCENTRATION (LEVEL OF ACTIVITY)
Heat	
Moist heat	75° to 100° C for 30 min (high)
Liquid	
Glutaraldehyde	2% (high)
Hydrogen peroxide	3% to 25% (high)
Formaldehyde	3% to 8% (high/intermediate)
Chlorine dioxide	Variable (high)
Peracetic acid	Variable (high)
Chlorine compounds	100 to 1000 ppm of free chlorine (high)
Alcohol (ethyl, isopropyl)	70% to 95% (intermediate)
Phenolic compounds	0.4% to 5.0% (intermediate/low)
Iodophor compounds	30 to 50 ppm of free iodine/L (intermediate)
Quaternary ammonium compounds	0.1% to 1.6% (low)

Murray et al. Medical Microbiology  
3rd ed., Mosby, 1998





# DISINFETTANTI

## Aldeidi

- Formaldeide e glutaraldeide sono dotate di rilevante attività disinfettante

- **Alchilazione dei gruppi polari funzionali (amminici, idrossilici, fenolici) delle proteine**

**Formaldeide 3-8%** (usato come disinfettante)

-Irrita le mucose, cancerogeno, forte odore

**Glutaraldeide 2% (Cidex)**

-Meno irritante e più efficace della formaldeide

### Glutaraldehyde

high-level disinfectant and chemical sterilant

- Aldehydes have a wide germicidal spectrum. Glutaraldehydes are bactericidal, virucidal, fungicidal, sporicidal and parasitocidal.
- They are used as a disinfectant or sterilant in both liquid and gaseous forms.
- Glutaraldehyde is used most commonly as a high-level disinfectant for medical equipment such as endoscopes.
- Glutaraldehyde should not be used for cleaning Noncritical surfaces because it is too toxic and expensive.



# AGENTI OSSIDANTI (perossido di idrogeno, acido peracetico).

Formazione di radicali ossidrilici in grado di ossidare sistemi enzimatici "critici" per il microrganismo.

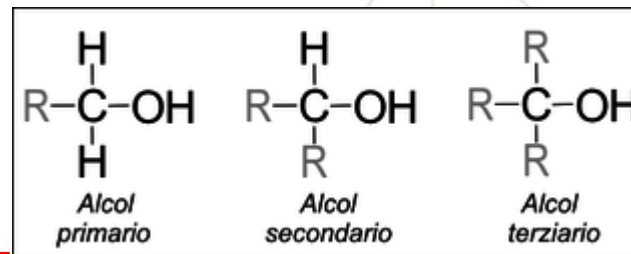
## **Battericidi, fungicidi, virucidi, sporicidi**

- $H_2O_2$  (come antisettico, non per ferite aperte)
- acido peracetico (come sterilizzante di strumentazione e matrici alimentari): battericida e fungicida (5 min), virucida e sporicida (30 min).



# DISINFETTANTI

## Alcoli



- Etanolo, isopropanolo (60-85%)

- **Danneggiano membrana citoplasmatica:**  
**denaturazione (coagulazione) delle proteine**  
**solubilizzazione dei lipidi**

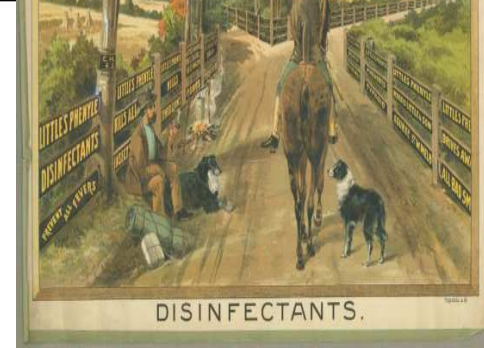
- Battericidi, fungicidi, tubercolicidi, virucidi
- Attività influenzata dalla presenza di materiale organico
- Isopropanolo più efficace dell'etanolo

Disinfettanti (sol. acquosa): superfici ben ventilate e lontane da fiamme



# DISINFETTANTI

## Fenoli e derivati fenolici



FENOLI e DERIVATI FENOLICI (fenolo, fenilfenolo, esaclorofene).

- Fenolo (Lister): tossico, corrosivo, carcinogenico.

Agiscono sulla membrana plasmatica mediante denaturazione proteica.

**Battericidi, fungicidi, tuberculicidi, virucidi**

- 2-5% (0.5%, HIV; 2%, funghi).
- attività persistente e non influenzata dalla presenza di materiale organico.





# COMPOSTI DELL'AMMONIO QUERNARIO (QUATs: banzalconio cloruro, cetrimide, clorexidina).

- Detergenti cationici
- Agiscono sulla membrana cellulare, inattivazione enzimatica, denaturazione (coagulazione) proteica.

**Batteriostatico (-cida ad elevate concentrazioni),  
sporostatico, fungistatico, virustatico**

- neutralizzati da materiale organico, saponi e detergenti anionici
- non corrosivi, non tossici, stabili, inodori.





Gli Istituti Zooprofilattici Italiani, la FAO (Food and Agriculture Organization) la WHO (World Health Organization), le Forze Armate dell'ONU, l'Esercito Italiano, Israeliano e Americano, e l'EPA (Environmental Protection Agency) hanno inserito nei loro protocolli di disinfezione, sia per uso umano che veterinario, un prodotto sanitizzante 'sistema perossidico biodegradabile acido' che unisce l'azione biocida a quella detergente: il Rely+On Virkon®.

**AZIONE BIOCIDICA IN SINERGIA CON UN AZIONE  
DETERGENTE**



## DISINFETTANTI

### PROPRIETA' DI-SINFETTANTE IDEALE

Aldeidi Ipocloriti NaDCC Alcoli QUACs Fenoli sintetici Clorexidina Acido Peracetico Virkon

SPETTRO TOTALE	+	+	-	-	-	-	+	+	+
VELOCITA' D'AZIONE	-	+	+	-	-	-	-	+	+
PULIZIA + DISINFEZIONE	-	-	-	+	-	-	-	-	+
SICUREZZA PERSONALE	-	+/-	+	+	+	+	+	-	+
SICUREZZA MATERIALI	+/-	-	-	+	-	-	-	-	+/-
USO MULTIPLO	-	-	-	-	-	-	-	-	+
RESISTENZA AL MATER.ORGANICO	-	-	-	+	-	-	-	+	+
SEMPLICITA' D'USO	-	+/-	-	+	-	-	-	-	+

# DISINFETTANTE IDEALE

- In linea con le linee guida di organizzazioni ufficiali note in campo internazionale (es. CDC, APIC, HIS...)
- Ampio spettro d'azione
- Elevato potere battericida
- Rapida azione e lunga persistenza
- Attività anche in presenza di sostanze organiche





# DISINFETTANTE IDEALE

- Buon potere di penetrazione e stabilità chimica
- Atossicità per l'uomo alle concentrazioni d'uso
- Non macchiante e non corrosivo
- Costo contenuto
- Facile maneggevolezza



# FATTORI CHE INFLUENZANO L'EFFICACIA DEI DISINFETTANTI CHIMICI

- Tempo d'azione
- Concentrazione d'uso
- Temperatura – pH
- Meccanismo di azione antimicrobica
- Natura del solvente
- Carica e resistenza microbica
- Fenomeni di inattivazione





**Table 1**  
Efficacy of tested disinfectants at different dilutions and contact times.

Disinfectant	Type of use	Use dilution	Final concentration	Contact time	Diagnostic test <sup>a</sup>		
					FAT	RTCIT	Molecular methods
Virkon® powder (50% w/w)	Label	1%	0.5 g/100 ml	15'	-	-	+
	Off label	1%	0.5 g/100 ml	30'	(-)	(-)	+
	Off label	1%	0.5 g/100 ml	1 h	(-)	(-)	-
Sodium hypochlorite (15% av. chl.)	Off label	10%	1.5%	15'	- <sup>b</sup>	-	+
	Off label	20%	3%	15'	(-)	(-)	+
	Off label	20%	3%	30'	(- <sup>b</sup> )	(-)	-
Phenolic (o-phenylphenol 11.4% w/w p-tert-amyphenol 2.3% w/w o-benzyl/-p-chlorophenol 8.2% w/w) (219,000 ppm)	Label	1%	2,190 ppm	30'	+	+	+
	Off label	1%	2,190 ppm	1 h	+	+	+
	Off label	5%	10,950 ppm	o.n.	- <sup>b</sup>	-	+
Biguanide (≤10%)	Label	1%	≤0.1%	30'	-	-	-
	Off label	10%	≤1%	30'	+	+	+
	Off label	1%	≤0.1%	30'	+	toxic	+
Benzalkonium chloride (≤5%)	Label	10%	≤1%	o.n.	+	+	+
	Off label	100%	≤5%	o.n.	- <sup>b</sup>	(toxic)	+
	Off label	100%	≤5%	15'	(- <sup>b</sup> )	(toxic)	+
	Label	100%	≤5%	30'	(- <sup>b</sup> )	(toxic)	+
	Off label	100%	≤5%	1 h	(- <sup>b</sup> )	(toxic)	+
	Off label	100%	≤5%	o.n.	(- <sup>b</sup> )	(toxic)	+

Efficacy of disinfection protocols was assessed by testing different dilution x contact time combinations, among those recommended by the manufacturer (label use) and, when label use resulted ineffective, through off label use. Chemical names of disinfecting substances are used rather than trade names, thus making the information universally suitable.

o.n. = overnight (16–18 h); av. chl. = available chlorine; (-) = the text in brackets means that the result ("negative", "toxic" or "high tissue denaturation and no antigen detection") was inferred based on the results of the previous testing condition (i.e. the lower concentration x contact time combination).

<sup>a</sup> FAT = Fluorescent Antibody Test; RTCIT = Rabies Tissue Culture Infection Test; molecular methods = the One Step RT-PCR (De Benedictis et al., 2011) and the One Step Real Time RT-PCR (modified from Wakeley et al., 2005).

<sup>b</sup> High tissue denaturation and no antigen detection.



# Caratteristiche dei principali sterilizzanti chimici

	HP (7.5%)	PA (0.2%)	Glut ( $\geq 2.0\%$ )
HLD Claim	30 m @ 20°C	NA	20-90 m @ 20°-25°C
Sterilization Claim	6 h @ 20°	12m @ 50-56°C	10 h @ 20°-25°C
Activation	No	No	Yes (alkaline glut)
Reuse Life <sup>1</sup>	21d	Single use	14-30 d
Shelf Life Stability <sup>2</sup>	2 y	6 mo	2 y
Disposal Restrictions	None	None	Local <sup>3</sup>
Materials Compatibility	Good	Good	Excellent
Monitor MEC <sup>4</sup>	Yes (6%)	No	Yes (1.5% or higher)
Safety	Serious eye damage (safety glasses)	Serious eye and skin damage (conc soln) <sup>5</sup>	Respiratory
Processing	Manual or automated	Automated	Manual or automated
Organic material resistance	Yes	Yes	Yes
OSHA exposure limit	1 ppm TWA	None	None <sup>6</sup>
Cost profile (per cycle) <sup>7</sup>	+ (manual), ++ (automated)	+++++ (automated)	+ (manual), ++ (automated)

Abbreviations: HLD=high-level disinfectant; HP=hydrogen peroxide; PA=peracetic acid; glut=glutaraldehyde; PA/HP=peracetic acid and hydrogen peroxide; OPA=ortho-phthalaldehyde (FDA cleared as a high-level disinfectant, included for comparison to other chemical agents used for high-level disinfection); m=minutes; h=hours; NA=not applicable; TWA=time-weighted average for a conventional 8-hour workday.

<sup>1</sup>number of days a product can be reused as determined by re-use protocol

<sup>2</sup>time a product can remain in storage (unused)

<sup>3</sup>no U.S. EPA regulations but some states and local authorities have additional restrictions

<sup>4</sup>MEC=minimum effective concentration is the lowest concentration of active ingredients at which the product is still effective

<sup>5</sup>Conc soln=concentrated solution

<sup>6</sup>The ceiling limit recommended by the American Conference of Governmental Industrial Hygienists is 0.05 ppm.

<sup>7</sup>per cycle cost profile considers cost of the processing solution (suggested list price to healthcare facilities in August 2001) and assumes maximum use life (e.g., 21 days for hydrogen peroxide, 14 days for glutaraldehyde), 5 reprocessing cycles per day, 1-gallon basin for manual processing, and 4-gallon tank for automated processing. + = least expensive; +++++ = most expensive

*Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities (CDC, 2008)*





Table 1. Descending Order of Resistance to Germicidal Chemicals

**Bacterial Spores**  
*Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*

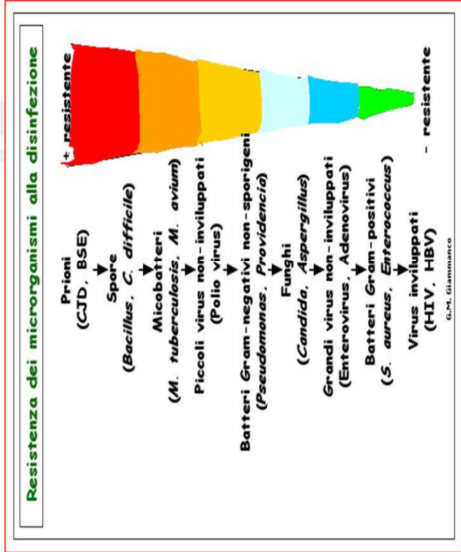
**Mycobacteria**  
*Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis*, Nontuberculous mycobacteria

**Nonlipid or Small Viruses**  
Poliovirus, Cocksackievirus, Rhinovirus

**Fungi**  
*Trichophyton* spp., *Cryptococcus* spp., *Candida* spp.

**Vegetative Bacteria**  
*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis*,  
Enterococci

**Lipid or Medium-size Viruses**  
Herpes simplex virus, CMV, Respiratory syncytial virus, HBV, HCV, HIV, Hantavirus,  
Ebola virus



# STERILIZZAZIONE

Processo chimico o fisico in grado di inattivare tutte le forme di microrganismi viventi che si attua tramite:

● **Mezzi fisici**

● **Mezzi chimici**



# STERILIZZAZIONE PROCESSO CHE COMPRENDE

- Raccolta
- Decontaminazione
- Lavaggio (manuale, automatico, ad ultrasuoni)
- Risciacquo (acqua corrente e demineralizzata)
- Asciugatura
- Confezionamento
- Sterilizzazione
- Conservazione materiali sterilizzati

Per ogni fase è necessario indossare gli idonei DPI



# STERILIZZAZIONE

Norma U.N.I. EN 556

“Sterilizzazione dei dispositivi medici”

...il livello di assicurazione di sterilità (SAL: Sterility Assurance Level) deve corrispondere alla probabilità teorica inferiore o uguale a 1 su 1 milione ( $SAL \leq 10^{-6}$ ) di trovare un microrganismo sopravvivente all'interno di un lotto di sterilizzazione





# STERILIZZAZIONE

## MEZZI FISICI

Calore

- umido
- secco

Filtrazione

Onde elettromagnetiche

- radiazioni UV
- radiazioni ionizzanti

Ultrasuoni

PR Murray et al. Medical  
Microbiology 3rd ed., Mosby, 1998

**TABLE 10-1 Methods of Sterilization**

METHOD	CONCENTRATION OR LEVEL
<b>PHYSICAL STERILANTS</b>	
Steam under pressure	121° or 132° C for various time intervals
Dry heat	1 hr at 171° C; 2 hr at 160° C; 16 hr at 121° C
Filtration	0.22- to 0.45- $\mu$ m pore size; HEPA filters
UV radiation	Variable exposure to 254-nm wavelength
Ionizing radiation	Variable exposure to microwave or gamma radiation
<b>GAS VAPOR STERILANTS</b>	
Ethylene oxide	450 to 1200 mg/L at 29° to 65° C for 2 to 5 hr
Formaldehyde vapor	2% to 5% at 60° to 80° C
Hydrogen peroxide vapor	30% at 55° to 60° C
Plasma gas	Highly ionized hydrogen peroxide gas
Chlorine dioxide gas	Variable
<b>CHEMICAL STERILANTS</b>	
Glutaraldehyde	2%
Peracetic acid	0.2%



# Sterilizzazione

## Tecniche FISICHE - calore

- Sterilizzante maggiormente utilizzato
- Tecnica indicata per la maggior parte dei materiali, eccetto i termosensibili, le sostanze chimiche tossiche o volatili
- Esistenza di una temperatura massima di crescita specie/ceppo-specifica

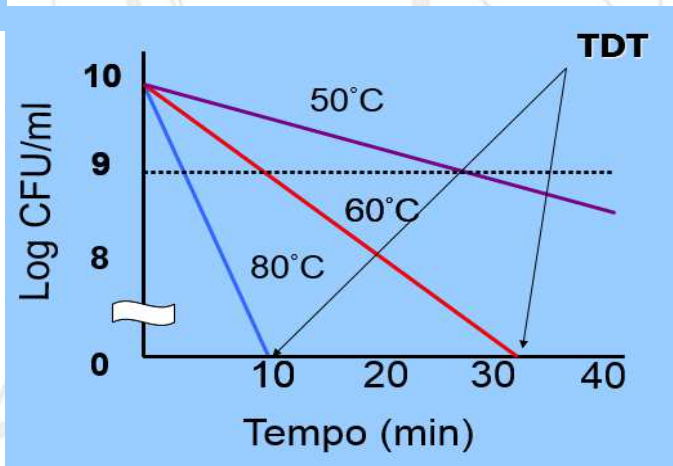
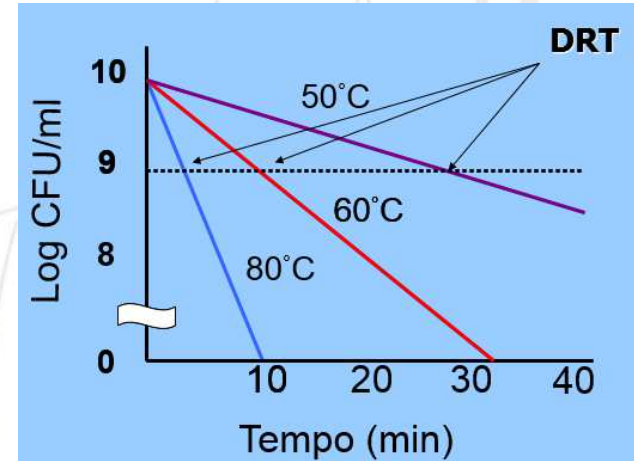
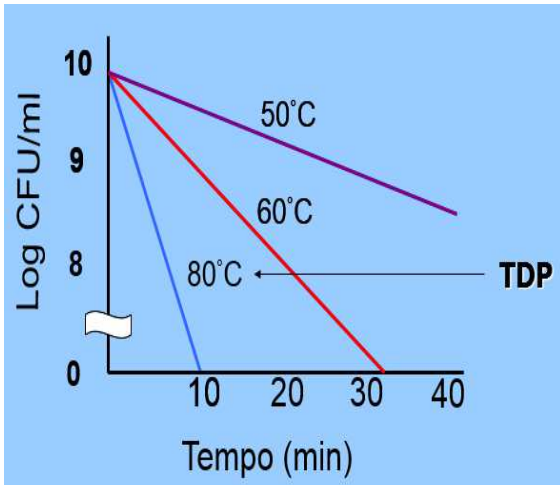
### **DENATURAZIONE :**



- **ossidazione (calore secco)**
- **coagulazione (calore umido)**



# PARAMETRI CHE INFLUENZANO LA TERMOSENSIBILITA' DI UN MICRORGANISMO



## CALORE UMIDO

**Agente sterilizzante:** vapore acqueo ad elevata temperatura (buona conducibilità termica e elevato potere penetrante)

Viene utilizzato nelle seguenti forme:

- Sterilizzazione frazionata
- Vapore fluente
- Vapore sotto pressione (AUTOCLAVE)





# Tecniche FISICHE – calore umido: autoclave

**Autoclave:** camera a pressione che utilizza vapore saturo (privo di aria) al quale si applica una pressione per ottenere elevate temperature.

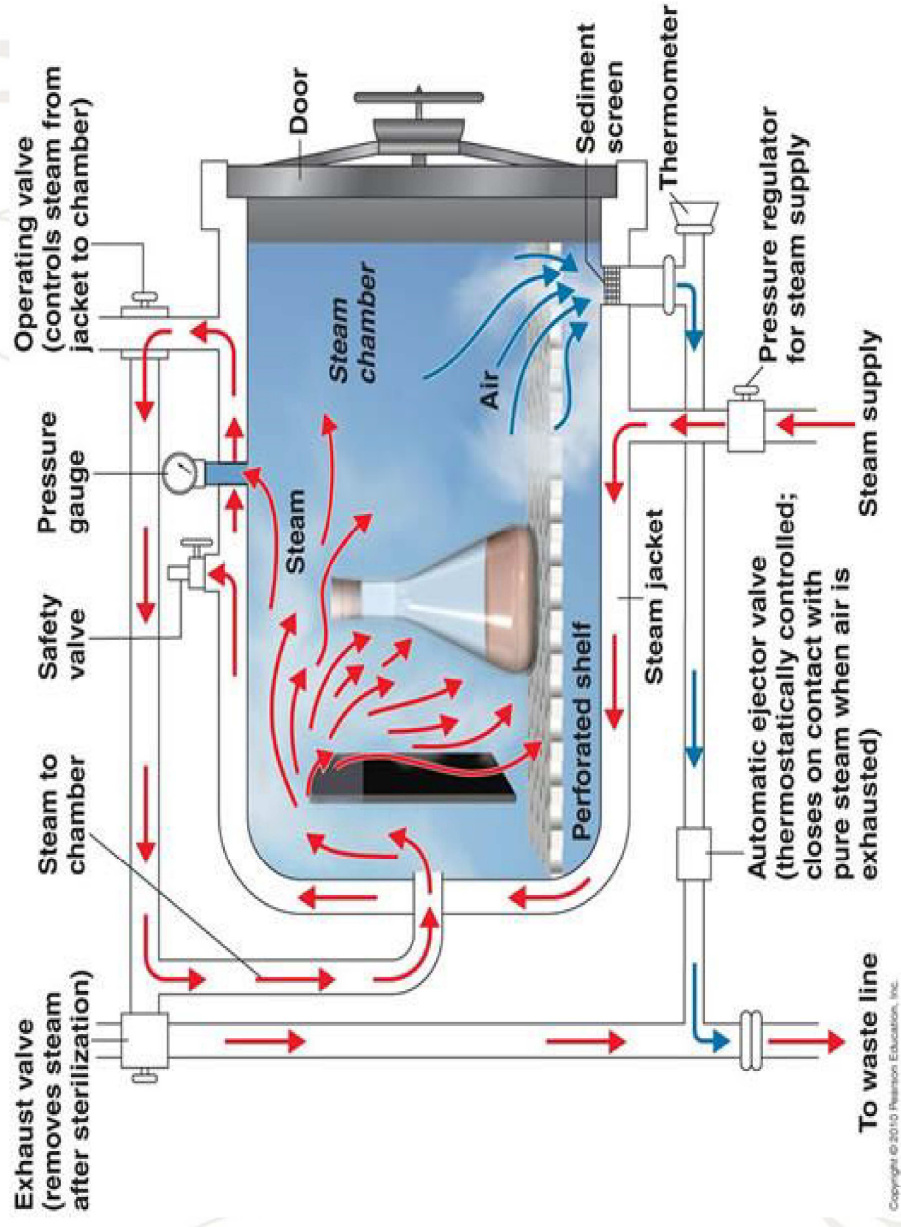
**Meccanismo di azione:** coagulazione irreversibile  
denaturazione delle proteine.

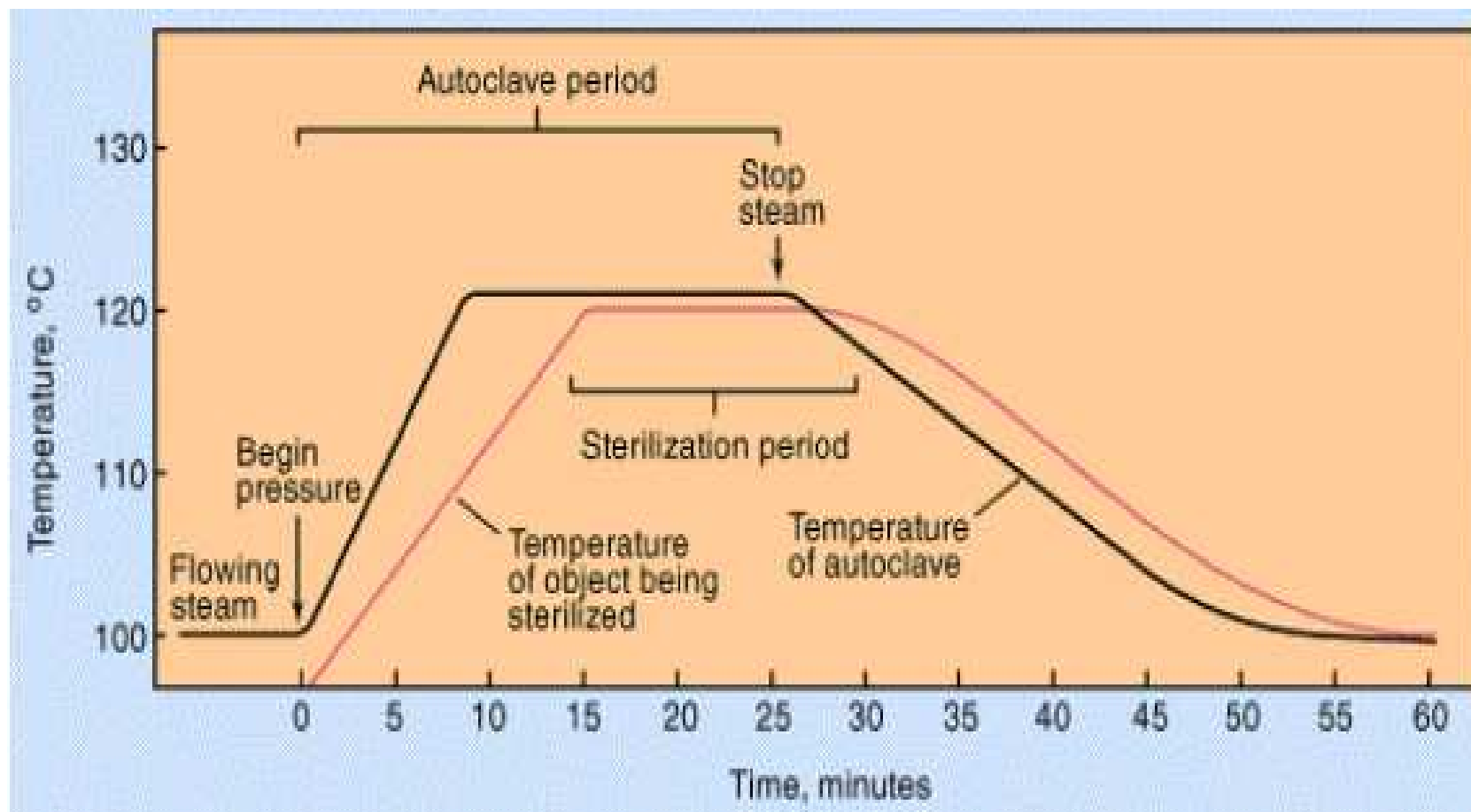
**Impiego:** adatta per: materiali termostabili e resistenti al vapore, terreni di coltura, rifiuti infettivi, contenitori di oggetti pungenti/taglienti.





***Autoclave:  
rimozione  
d'aria per  
gravità***

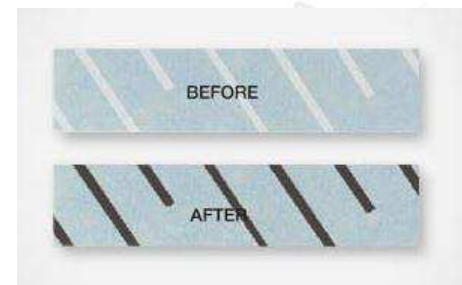
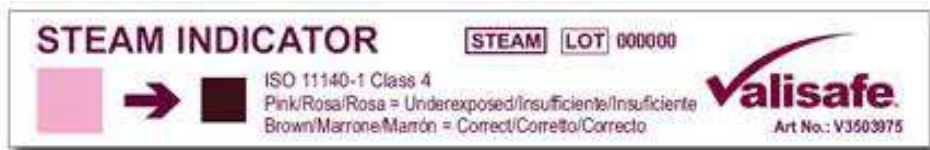




Il ciclo di sterilizzazione«classico» di un trattamento in autoclave prevede: **121°C, 15 min, 1 atm.**

Tuttavia, il ciclo può essere personalizzato in base alla tipologia di materiale.





L'efficacia del ciclo di sterilizzazione viene monitorata mediante indicatori **meccanici, chimici o biologici**





# STERILIZZAZIONE A SECCO

**Flambaggio**



**Incenerimento**



**Stufa a secco**



# IL CALORE SECCO

L'agente sterilizzante è l'aria calda, richiede un tempo ed una temperatura maggiori di quelle impiegate col calore umido, non essendo l'aria un buon conduttore del calore.

**180°C-200°C x 60'-90'**

- efficacia = ottima
- impieghi = vetreria, materiali anidri che non possono essere alterati dal contatto col vapore, strumenti metallici

## DISINFEZIONE/STERILIZZAZIONE CON IL CALORE

### Forno Pasteur o Stufa a secco

Combinazioni tempo/temperatura:

180°C per 30'  
170°C per 60'  
160°C per 120'  
170°C per 150'  
140°C per 180'

### Materiali sterilizzabili

Vetreria di laboratorio  
Strumenti di metallo  
Porcellane  
Sostanze termostabili

Il materiale deve essere lavato, asciugato, confezionato e non ammassato





# Sterilizzazione tecniche FISICHE – filtrazioni



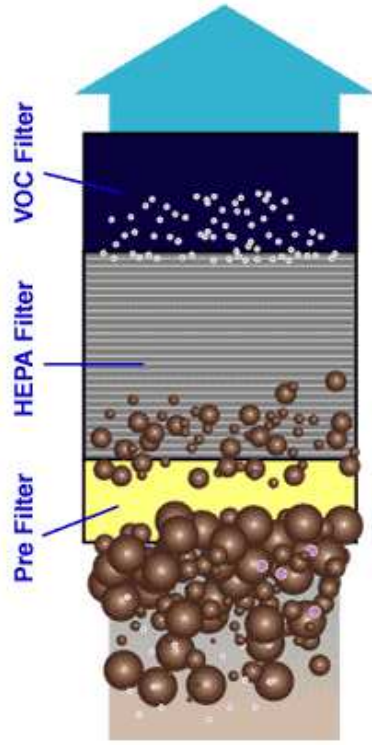
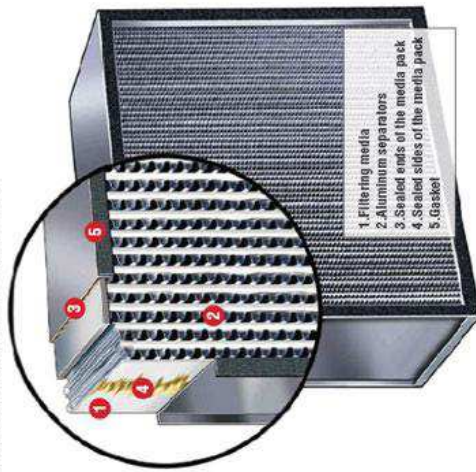
Questa tecnica non garantisce una “reale” sterilità: alcuni microrganismi, dotati di dimensioni medie  $< 0.22 \mu\text{m}$  (es. virus, micoplasmi), non possono essere filtrati.

A tal fine, si utilizzano filtri (nitrato od acetato di cellulosa) i cui pori hanno un diametro ( $0.22 \mu\text{m}$ ) inferiore alle dimensioni medie di gran parte dei microrganismi.

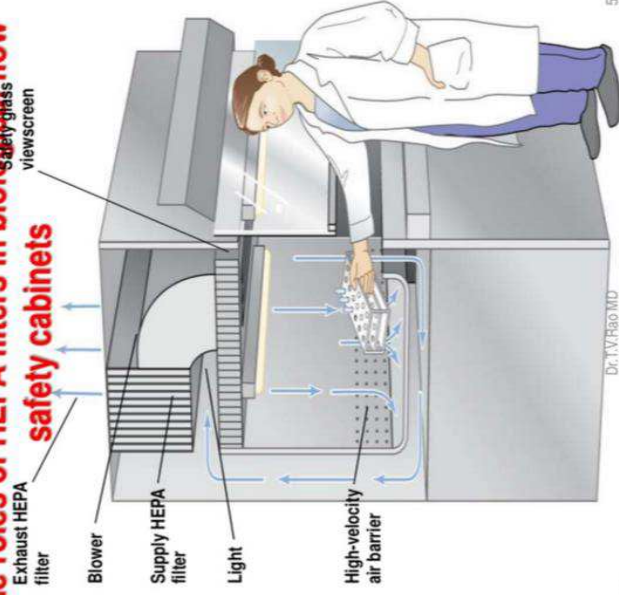
Utilizzata per prodotti termolabili che non possono essere sterilizzati in altro modo



A closer look at a HEPA filter



## The roles of HEPA filters in biological flow safety cabinets



2/2/2012

Dr. Y. Zhao MD

57





# STERILIZZAZIONE

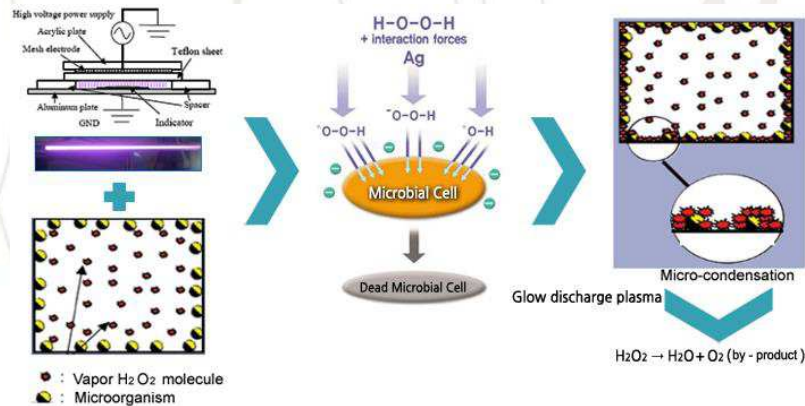
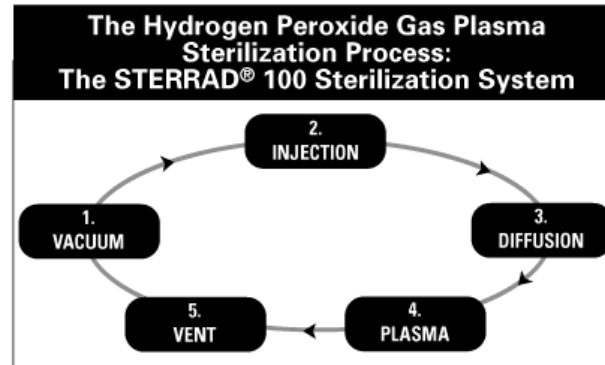
## MEZZI CHIMICI

OSSIDO DI ETILENE

GAS PLASMA

GLUTARALDEIDE

ACIDO PARACETICO



# STERILIZZAZIONE CHIMICA

## Acido peracetico, Glutaraldeide

### **Acido peracetico**

- agente ossidante
- immersione
- micronizzato: industria alimentare, strumenti chirurgici
- efficace in presenza di materiale organico, prodotti finali non tossici

### **Glutaraldeide**

- agente alchilante
- immersione , tempi lunghi (ore)
- impiegata per materiale medico-chirurgico e prep. di vaccini
- irritazione mucose respiratorie, dermatite da contatto



# STERILIZZAZIONE CHIMICO - FISICA

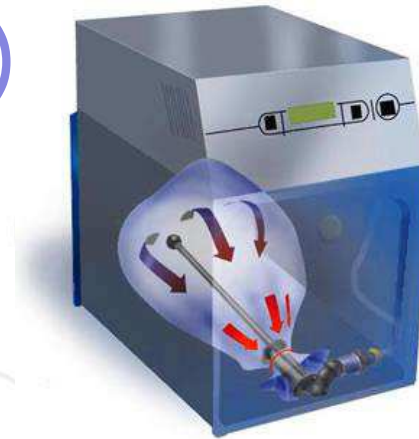
## Ossido di Etilene (ETO)

- Alchilazione di gruppi funzionali (amminici, carbossilici, fenolici, idrossilici)

- Sterilizzazione di materiale di laboratorio termosensibile (plastica)

- 12% ETO + 88% Freon (oppure CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>)

L'utilizzo deve essere regolamentato: ETO è carcinogeno e mutageno

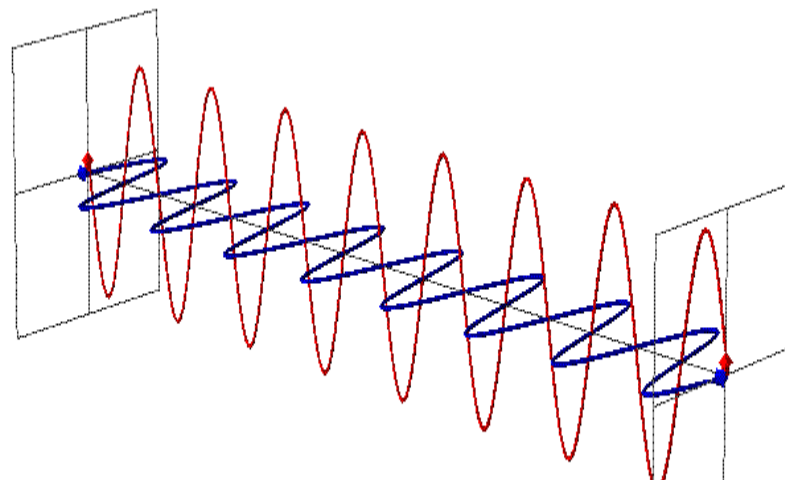


# Sterilizzazione Tecniche FISICHE – onde elettromagnetiche

- radiazioni elettromagnetiche a corta  $\lambda$  (alta energia)
- effetto letale per azione ionizzante
- i costi elevati ne limitano l'utilizzo a processi industriali
- strumentazione/dispositivi medicali (monouso: aghi, siringhe, cateteri, guanti; terreni di coltura, strum. chirurgici)

**SVA**

- penetrano nei tessuti
- mutagene per l'uomo

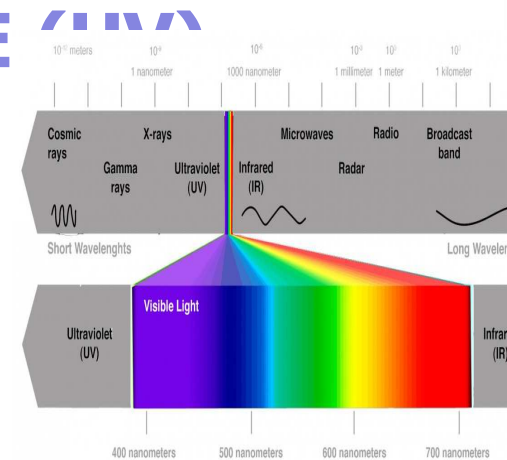




# RADIAZIONI ULTRAVIOLETTE

- onde elettromagnetiche ( $\lambda=220-300$  nm)
- danno cellulare

Maxi effetto letale a 260 nm.



## Applicazioni

- decontaminazione di superfici, aria, acqua in ambienti confinati
- limita la quantità di amplificati (PCR) sulle superfici
- sterilizzazione "a freddo" di composti chimici, materiali plastici ad uso farmaceutico, siero per colture cellulari

## Fattori critici

Scarsa capacità di penetrazione- azione mutagena





- 450.000 - 700.000 infezioni , il 30% circa delle quali prevenibili.

La cute, od i guanti, possono essere veicolo di contaminazione per batteri e virus

**IL LAVAGGIO DELLE MANI RAPPRESENTA LA PRINCIPALE MISURA DI CONTROLLO DELLA DIFFUSIONE DELLE INFEZIONI IN AMBITO SANITARIO.**

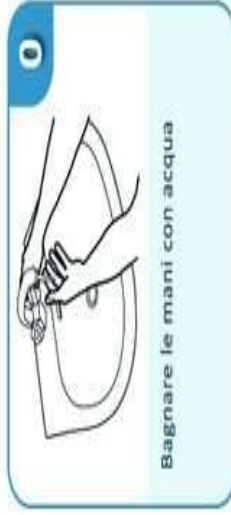
“Un rigoroso intervento sul lavaggio delle mani è in grado di prevenire circa il 40% di tutte le infezioni nosocomiali”  
(Center for Diseases Control – Atlanta, USA)



# Come lavarsi le mani?

Lavare le mani quando sono sporche, oppure utilizzare le salviettine monouso

Durata della procedura: 40-60 secondi



Bagnare le mani con acqua



Applicare sapone a sufficienza sino a ricoprire tutta la superficie delle mani



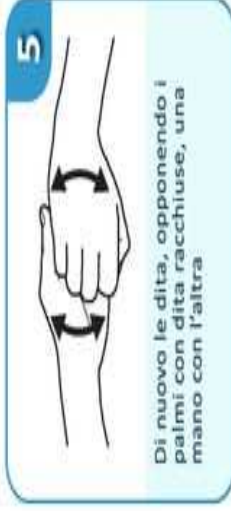
Strofinare le mani da un palmo all'altro



Palmo destro sul dorso sinistro incrociando le dita e viceversa



Palmo a palmo con le dita intrecciate



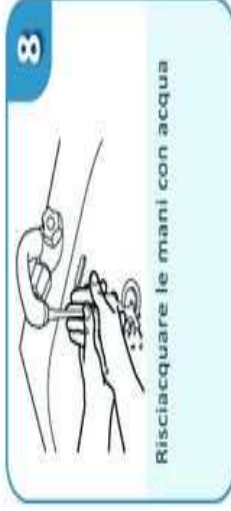
Di nuovo le dita, opponendo i palmi con dita racchiuse, una mano con l'altra



Strofinare attraverso rotazione del pollice sinistro sul palmo destro e viceversa



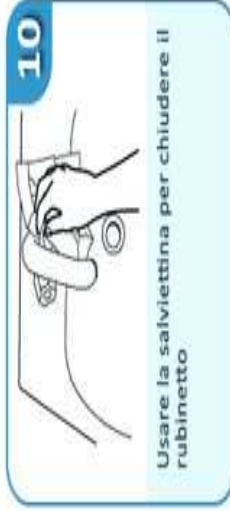
Strofinare attraverso rotazione, all'indietro e in avanti con le dita della mano destra sul palmo sinistro e viceversa



Risciacquare le mani con acqua



Asciugare le mani con una salviettina monouso



Usare la salviettina per chiudere il rubinetto



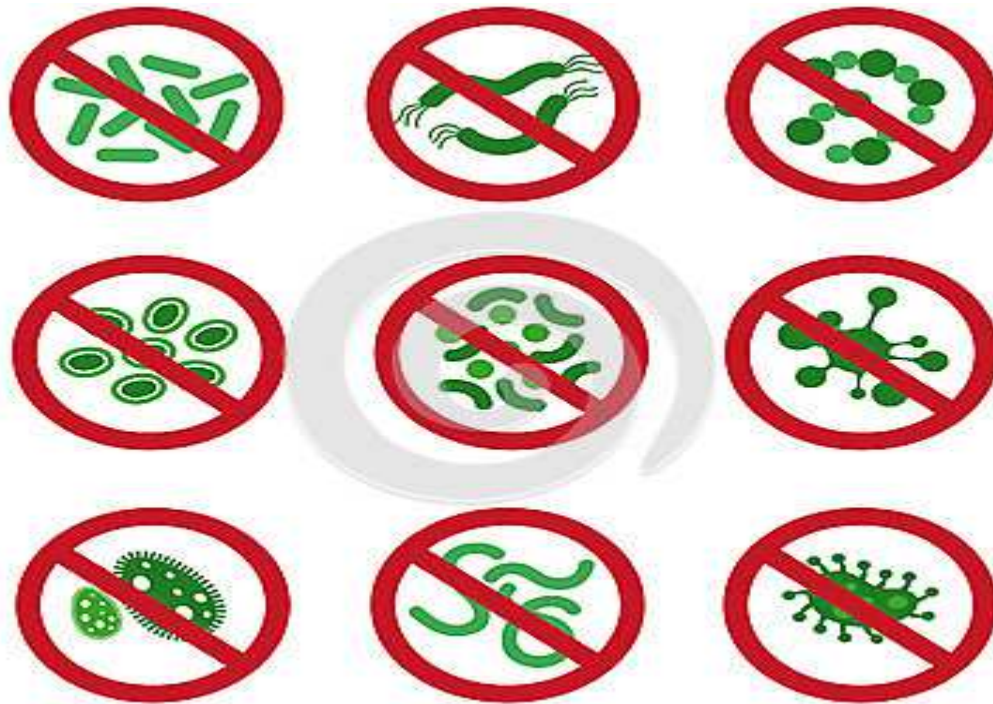
Le mani sono ora pulite

Fonte: World Health Organization





*GRAZIE A TUTTI PER LA  
COLLABORAZIONE*



*.....E PER L'ATTENZIONE*

