

**ISTRUZIONI PER L'USO**

MUELLER HINTON BROTH

(CATION-ADJUSTED)

Terreno di coltura in polvere

1 - DESTINAZIONE D'USO

Diagnostico *in vitro*. Terreno liquido, con contenuto di cationi ottimizzato, per l'esecuzione del test di sensibilità agli antibiotici, con il metodo delle diluizioni in brodo.

2 – COMPOSIZIONE**FORMULA TIPICA (PER LITRO, DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA)***

Estratto di carne	2,0 g
Digerito acido di caseina	17,5 g
Amido solubile	1,5 g

*Il terreno può essere compensato e/o corretto per adeguare le sue prestazioni alle specifiche.

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Alla fine degli anni '20 del secolo scorso, Alexander Fleming contribuì allo sviluppo della tecnica della diluizione in brodo, utilizzando la torbidità del brodo come determinazione del punto finale della reazione.¹ Questo metodo è stato considerato come un precursore della metodologia contemporanea della Concentrazione Minima Inibente (CMI). Alla fine degli anni '50 fu evidente la necessità di standardizzare il test di sensibilità agli antibiotici e diverse organizzazioni e ricercatori iniziarono ad affrontare questo problema critico e l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) pubblicò un rapporto sulla standardizzazione della metodologia AST.² Ericsson e Sherris usarono per primi il termine 'breakpoint' e pubblicarono una revisione di diverse tecniche per i test di sensibilità e la relazione tra i metodi di diluizione e diffusione.³ Successivamente, negli anni '80, il Clinical and Laboratory Standards Institute consolidò i metodi e gli standard per la determinazione della CMI per l'uso clinico. I protocolli che utilizzano il Mueller Hinton Broth e la tecnica delle micro-diluizione ed i parametri per definire i breakpoint di sensibilità e resistenza stabiliti dal CLSI⁴ e da EUCAST,⁵⁻⁷ sono ora considerati come gold standard negli Stati Uniti ed in Europa.

Con poche eccezioni, la micro-diluizione in brodo con Mueller Hinton Broth con concentrazioni standardizzate di cationi, è il metodo di riferimento per il test di sensibilità antimicrobica dei batteri aerobi a crescita rapida.⁷ Per gli organismi esigenti, EUCAST raccomanda di eseguire i test secondo la norma ISO 20776-1,⁸ ma con l'uso di Mueller Hinton Broth addizionato con 5% di sangue lisato di cavallo e 20 mg/L di β -NAD (MH-F). La concentrazione più bassa, espressa in mg/L o μ g/mL, dell'agente antimicrobico che inibisce la crescita visibile di un microrganismo è definita come Concentrazione Minima Inibente (CMI).

Nel Mueller Hinton Broth, il digerito acido di caseina e l'estratto di carne forniscono azoto, carbonio e minerali per la crescita batterica. Queste materie prime sono selezionate con un basso contenuto di timina e timidina come determinato dai valori di CMI con *Enterococcus faecalis* e sulfametossazolo-trimetoprim (SXT). Nel Mueller Hinton Broth, le concentrazioni di calcio, magnesio e ioni di zinco sono regolate per fornire le quantità raccomandate dagli Standard ISO^{8,9}: Ca⁺⁺: 20-25 mg/L, Mg⁺⁺: 10-12,5 mg/L, Zn⁺⁺: < 3 mg/L. Il test di sensibilità di *Pseudomonas aeruginosa* con aminoglicosidi e con altri antibiotici è influenzato dalla presenza di ioni calcio e magnesio¹⁰ mentre lo ione zinco ha un'attività inibitoria sulla sensibilità di *P. aeruginosa* ai carbapenemi¹¹.

4 – METODO DI PREPARAZIONE

Sospendere 21 g in 1000 ml di acqua purificata fredda. Scaldare per sciogliere completamente la polvere, distribuire e sterilizzare in autoclave a 121°C per 10 minuti. Non surriscaldare.

5 – CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto della polvere	fine granulometria omogenea, beige
Aspetto del terreno in soluzione ed in piastra	colore paglierino chiaro, limpido, senza precipitato visibile.
pH finale a 20-25 °C	7,3 \pm 0,1

6 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Mueller Hinton Broth	Terreno in polvere	4017412	500 g (23,8 L)

7 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, termostato ed altra strumentazione di laboratorio, piastre a micro-pozzetti sterili, provette, flaconi o beute autoclavabili, anse da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori per l'identificazione delle colonie, antibiotici.

8 – CAMPIONI

Il test di sensibilità con il metodo diluizioni in brodo è effettuato su colture pure dei ceppi in esame, isolati da campioni clinici. Mueller Hinton Broth non è destinato all'isolamento microbico direttamente da campioni clinici. È consigliabile una colorazione Gram e un'identificazione batterica preliminare per la scelta appropriata degli agenti antimicrobici da testare.

9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Mueller Hinton Broth può essere utilizzato per la preparazione dell'inoculo e per la preparazione delle diluizioni degli antibiotici per le procedure di micro-diluizione o macro-diluizione. La procedura di micro-diluizione qui descritta è una sintesi del protocollo ISO 20776-1.⁸

Preparazione delle soluzioni di lavoro e delle piastre a pozzetti

L'intervallo delle concentrazioni dell'antibiotico selezionato per il test dipende dal microrganismo e dall'agente antimicrobico. L'intervallo scelto deve consentire la determinazione completa della CMI per i ceppi di riferimento appropriati. La soluzione stock degli antibiotici deve essere preparata nel solvente appropriato alla concentrazione 1 mg/mL e le diluizioni successive fatte in Mueller Hinton Broth. Le diluizioni devono essere preparate secondo la procedura descritta nell'allegato C di ISO 20776-1.⁸





Le soluzioni di lavoro devono essere utilizzate lo stesso giorno, a meno che non siano disponibili informazioni sulla stabilità delle soluzioni in condizioni di conservazione specifiche.

Dispensare le soluzioni di lavoro nelle piastre a micro-pozzetti in ragione di 50 µl per pozzetto con il doppio delle concentrazioni finali desiderate di antibiotico, o in ragione di 100 µl per pozzetto nelle concentrazioni finali desiderate.

Almeno un pozzetto, contenente 50 µl o 100 µl di terreno senza agente antimicrobico, deve essere incluso come controllo di crescita per ogni ceppo testato. Allo stesso modo, deve essere incluso un pozzetto contenente 100 µl di terreno privo di agenti antimicrobici come pozzetto di controllo negativo non inoculato per ogni tipo di microrganismo testato.

Preparazione dell'inoculo

L'inoculo può essere preparato diluendo una coltura in brodo di 18 ore o sospendendo in Mueller Hinton Broth diverse colonie morfologicamente simili coltivate su un terreno in piastra non selettivo.

In entrambi i casi diluire la sospensione batterica con soluzione salina o brodo per ottenere una torbidità equivalente allo standard 0,5 McFarland. Tale sospensione conterrà circa da 1×10^8 a 2×10^8 UFC/mL.

L'inoculo tarato come sopra descritto deve essere diluito in Mueller Hinton Broth per dare un numero finale di cellule di 5×10^5 UFC/mL.

Semina delle piastre per micro-diluizione

Inoculare le piastre entro 30 minuti dalla standardizzazione della sospensione dell'inoculo.

Ad ogni pozzetto contenente 50 µl di agente antimicrobico diluito in brodo, aggiungere un volume di 50 µl di sospensione batterica. Per i pozzetti che contengono 100 µl di agente antimicrobico diluito in brodo, aggiungere 10 µl di sospensione batterica.

Sulla sospensione batterica eseguire una conta delle cellule vitali per garantire che i pozzetti contengano $5 \times 10^5 > \text{UFC/mL}$. A tal fine rimuovere 10 µl dal pozzetto di controllo della crescita immediatamente dopo la semina e diluire in 10 ml di brodo o di soluzione salina. Seminare 100 µl di questa diluizione sulla superficie di una piastra di terreno adatto (es. Tryptic Soy Agar), ed incubare per 12-18 ore.

La sospensione batterica può essere considerata accettabile se sulla piastra si sviluppano da 20 a 80 colonie. Se il numero delle colonie fosse diverso, è necessario intraprendere un'azione correttiva per garantire una corretta preparazione dell'inoculo.

Metodo della macro-diluizione in provetta

Se il volume della soluzione antimicrobica nella provetta è di 1 mL, diluire l'inoculo standardizzato 1:100 in Mueller Hinton Broth (0,1 mL per una provetta da 10 mL di brodo).

Aggiungere 1,0 mL dell'inoculo standardizzato a ciascuna provetta contenente la soluzione di antibiotico e 2,0 mL in una provetta sterile vuota per il controllo della crescita.

Incubazione

Per la maggior parte delle combinazioni agente antimicrobico-ceppo in esame, incubare a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ in aerobiosi per 18 ± 2 ore

10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Leggere i risultati solo quando c'è una crescita sufficiente del ceppo in esame (evidente torbidità nel pozzetto di controllo della crescita), quando non c'è crescita nel pozzetto di controllo non inoculato e quando sia stata verificata la purezza e l'appropriata concentrazione batterica nell'inoculo.

Confrontare la crescita in ogni pozzetto con quella nel controllo di crescita positivo, e registrare la CMI come la più bassa concentrazione dell'antibiotico che inibisce completamente la crescita visibile. Ci sono eccezioni a questo schema (per esempio, *trailing endpoints* per il linezolid, inibizione parziale da parte dei sulfamidici, inibizione incompleta con alcuni agenti batteriostatici) che richiedono un'attenzione speciale da parte dell'utilizzatore.

11 - CONTROLLO QUALITÀ DELL'UTILIZZATORE

Prima del rilascio alla vendita, Mueller Hinton Broth è controllato per verificarne la conformità alle specifiche. È comunque responsabilità dell'utilizzatore eseguire un proprio controllo di qualità con modalità in accordo alle normative vigenti in materia, alle regole dell'accreditamento ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. Si raccomanda che l'utilizzatore faccia riferimento alla guida ISO⁹ e/o CLSI⁴ pertinente per le proprie procedure di Controllo Qualità.

12 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di terreno in polvere Mueller Hinton Broth sono testati per la produttività, per il test di sensibilità agli antibiotici con metodo delle micro-diluizioni e con il dosaggio degli ioni calcio, magnesio e zinco, avendo come riferimento un lotto precedentemente approvato e considerato come Lotto di Riferimento.

La produttività è valutata con il metodo delle diluizioni ad estinzione in provetta, inoculando 1 mL di diluizioni decimali appropriate dei microrganismi ed incubando a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ in aerobiosi per 18 ± 2 ore e registrando la diluizione più alta che mostra la crescita nel Reference Batch (GrRB) e nel Test Batch (GrTB). La produttività viene testata con i seguenti ceppi: *E. faecalis* ATCC 29212, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 29213. L'indice di produttività $Gr_{RB}-Gr_{TB}$ per ogni ceppo di prova deve essere ≤ 1 .

Il test di sensibilità viene eseguito con la tecnica della micro-diluizione con i seguenti ceppi: *E. faecalis* ATCC 29212, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 29213. Gli antibiotici sono scelti lotto per lotto per garantirne la rotazione.

Le concentrazioni di calcio, magnesio e zinco sono misurate per ogni lotto di produzione di Mueller Hinton Broth, per assicurare la riproducibilità da lotto a lotto e la conformità alle specifiche.

13 - LIMITI DEL METODO

- La concentrazione errata dell'inoculo, la conservazione impropria delle piastre, il pH fuori dalle specifiche, la misurazione impropria degli *endpoint*, possono produrre risultati errati.¹²
- Alcuni meccanismi di resistenza possono non essere sempre espressi con il metodo delle diluizioni in brodo, ad esempio l'espressione di alcune β -lattamasi, pompe di efflusso o modifiche del sito bersaglio del farmaco. In questi casi, la CMI deve essere interpretata con cautela, o devono essere utilizzate altre informazioni per guidare la terapia clinica.⁸
- La sensibilità *in vitro* di un organismo ad uno specifico agente antimicrobico, di per sé non significa che esso possa essere efficace come agente terapeutico *in vivo*. Consultare i riferimenti bibliografici appropriati per i dettagli sull'interpretazione dei risultati.^{13,14}
- I batteri che richiedono timina o timidina possono non crescere in modo soddisfacente su Mueller Hinton Broth a causa dei bassi livelli di timina o timidina.¹⁵
- Il Mueller Hinton Broth non supplementato non è idoneo per batteri a crescita lenta, per batteri esigenti come *Haemophilus*, *Neisseria* ed alcuni streptococchi. Per tali microrganismi consultare i metodi proposti da EUCAST e CLSI.
- La tigeclina deve essere testata entro 12 ore dalla preparazione del Mueller Hinton Broth.¹⁶
- Per testare dalbavancina, teleavancina e oritavancina, al Mueller Hinton Broth deve essere aggiunto polisorbato-80 (0,002%).¹⁷
- Per testare cefiderocol, Mueller Hinton Broth deve essere prima depletato di ferro con un composto chelante e poi addizionato nuovamente con concentrazioni standard di calcio, magnesio e zinco.¹⁸





- La micro-diluizione in brodo può non rilevare in modo affidabile la resistenza conferita dal gene *mecA* o *mecC*.⁸
- Per il rilevamento della resistenza alla meticillina in *Staphylococcus* spp. con oxacillina, è necessario aggiungere al terreno NaCl a una concentrazione finale di 20 g/L.
- Per il test con daptomicina, Mueller Hinton Broth deve essere addizionato di Ca⁺⁺ ad una concentrazione finale di 50 mg/L.¹⁹
- Quando si testano i glicopeptidi, la CMI deve essere letta dopo 24 ore di incubazione per fornire risultati coerenti ed affidabili; esaminare attentamente le provette o i pozzetti per verificare la presenza anche di una debole crescita.^{4,8}
- Il test di sensibilità in brodo con mecillinam non è raccomandato. Risultati stabili e riproducibili sono forniti dai metodi dell'agar-diluizione o della disco-diffusione.²⁰
- La micro-diluizione in brodo può non dare risultati affidabili con la fosfomicina. Il metodo di riferimento per tale antibiotico è la diluizione in agar.⁸
- Poiché la colistina mostra affinità per la plastica dei pozzetti, i risultati ottenuti con la micro-diluizione possono essere soggetti a problemi di riproducibilità o imprecisione.²¹
- È stato osservato e riportato da alcuni studi un fenomeno distinto comunemente indicato come "skipped wells", caratterizzato dalla mancanza di crescita nei pozzetti con concentrazioni intermedie di colistina seguita da crescita nei pozzetti con concentrazione più alta.²²
- Mueller Hinton Broth deve essere inteso come un ausilio nel trattamento delle malattie infettive; l'interpretazione dei risultati deve essere fatta considerando la storia clinica del paziente, l'origine del campione e i risultati di altri test diagnostici.

14 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno qui descritto è un diagnostico *in vitro* di tipo qualitativo, per uso professionale e deve essere usato in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni.
- I terreni in polvere devono essere manipolati con adeguate protezioni. Prima dell'uso consultare la scheda di sicurezza.
- Il terreno di coltura qui descritto contiene materiali di origine animale. I controlli *ante* e *post mortem* degli animali e quelli durante il ciclo di produzione e distribuzione delle materie prime non possono garantire in maniera assoluta che questo prodotto non contenga nessun agente patogeno trasmissibile; per queste ragioni si consiglia di manipolare il prodotto con le precauzioni di sicurezza specifiche per i materiali potenzialmente infettivi (non ingerire, non inalare, evitare il contatto con la pelle, gli occhi, le mucose). Scaricare dal sito web www.biolifeitaliana.it il documento TSE Statement, con le misure messe in atto da Biolife Italiana S.r.l. per il contenimento del rischio legato alle patologie animali trasmissibili.
- Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura.
- Trattare i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminanti come terreno di coltura o agenti microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire il terreno non utilizzato ed il terreno inoculato con i campioni o con ceppi microbici e sterilizzato, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare il prodotto qui descritto come principio attivo per preparazioni farmaceutiche o come materiale per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza del prodotto sono disponibili sul sito www.biolifeitaliana.it.
- Comunicare a Biolife Italiana Srl (complaint@biolifeitaliana.it) ed alle Autorità competenti qualsiasi incidente grave verificatosi in relazione all'uso del diagnostico *in vitro*.
- Le informazioni contenute in questo documento sono state definite al meglio delle nostre conoscenze e capacità e rappresentano una linea guida al corretto impiego del prodotto, ma senza impegno o responsabilità. L'utilizzatore finale deve in ogni caso, rispettare le leggi, i regolamenti e le procedure standard locali per l'esame dei campioni raccolti dai diversi distretti organici umani ed animali, dei campioni ambientali e dei prodotti destinati al consumo umano o animale. Le nostre informazioni non esonerano l'utilizzatore finale dalla sua responsabilità di controllare l'idoneità dei nostri prodotti allo scopo previsto.

15 - CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Conservare a +10°C /+30°C al riparo della luce e dell'umidità. In queste condizioni il prodotto rimane valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. Evitare di aprire il flacone in ambienti umidi. Una volta aperto, conservare il prodotto mantenendo il tappo del contenitore ben chiuso. Eliminare il prodotto nel caso il contenitore e/o il tappo fossero danneggiati, nel caso i contenitori non fossero ben chiusi o in caso di evidente deterioramento della polvere (modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi). L'utilizzatore è responsabile del processo di preparazione del terreno e della validazione del periodo di validità del prodotto finito, in funzione della tipologia (piastre a pozzetti/provette/flaconi) e del metodo di conservazione applicato (temperatura e confezionamento).

15 - BIBLIOGRAFIA

1. Fleming, A. 1929. On the antimicrobial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. Br. J. Exp. Pathol. 10:225-236.
2. Ericsson, H.M., and Sherris, J.H. 1971. Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect B Suppl. 217:1-90.
3. World Health Organization. (1961). Standardization of Methods for Conducting Microbic Sensitivity Tests. Second Report of the Expert Committee on Antibiotics. WHO Technical Report Series, No. 210. WHO, Geneva
4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for bacteria that grow aerobically 7th ed. CLSI approved standard M7 A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2006
5. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 12.0, valid from 2022-01-01
6. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST reading guide for broth microdilution Version 4.0, January 2022
7. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Media preparation for EUCAST disk diffusion testing and for determination of MIC values by the broth microdilution method. Version 6.0 January 2020
8. ISO 20776-1:2019 Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices — Part 1: Broth micro-dilution reference method for testing the *in vitro* activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases
9. ISO/TS 16782:201 Clinical laboratory testing — Criteria for acceptable lots of dehydrated Mueller-Hinton agar and broth for antimicrobial susceptibility testing.
10. Reller, LB, Schoenknecht FD, Kenny M A, Sherris J C. Antibiotic susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa*: selection of a control strain and criteria for magnesium and calcium control. J Infect Dis 1974; 130:454-463.
11. Daly JS, Dodge RA, Glew RH, Doja DT, Deluca BA, Herbert S. Effect of Zinc Concentration in Mueller-Hinton Agar on Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to Imipenem. J Clin Microbiol. 1997; 35(4): 1027-2029





12. Matushek E. EUCAST Educational Workshop. Technical problems and controversies in antimicrobial susceptibility testing. ECCMID 2017, Vienna, Austria
13. Turnidge JD, Jorgensen JH. Susceptibility Test Methods: General Considerations. In Carrol KC, Pfaller MA et al. editors. Manual of clinical microbiology, 12th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2019.
14. Koeth LM, Miller LA. Antimicrobial Susceptibility Test Methods: Dilution and Disk Diffusion Methods. In Carrol KC, Pfaller MA et al. editors. Manual of clinical microbiology, 12th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2019.
15. Haltiner RC, Migneault PC, Robertson RG. Incidence of thymidine-dependent enterococci detected on Mueller-Hinton Agar with low thymidine content Antimicrob Agents Chemother 1980; 18: 365-368
16. Bradford PA, Petersen PJ, Young M. et al. , Tigecycline MIC testing by broth dilution requires use of fresh medium or addition of the biocatalytic oxygen-reducing reagent oxyrase to standardize the test method. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49:3903-3909
17. Rennie RP, Koeth L., Jones RN et al. Factors influencing broth microdilution antimicrobial susceptibility test results for dalbavancin, a new glycopeptide agent. J Clin Microbiol. 2007; 45:3151-3154.
18. Akinobu I, Toru Nishikawa T, Matsumoto S. et al. , Siderophore cephalosporin cefiderocol utilizes ferric iron transporter systems for antibacterial activity against Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother. 2016; 60:7396-7401.
19. Fucus PC, Barry AL, Brown SD. Daptomycin susceptibility tests: interpretive criteria, quality control and effect of calcium on in vitro tests. Diag Microbiol Infect Dis. 2000; 38:51-58
20. Skov R, Frimot-Moller N, Menday P. et al. Susceptibility testing of urinary isolates of Escherichia coli to mecillinam using NCCLS methodology. International Antimicrob Agents. 2005; 25:198-202
21. European Centre for Disease Prevention and Control Recommendations for MIC Determination of Colistin (Polymyxin E) As Recommended by the Joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. ECDC; Stockholm, Sweden: 2016.
22. Elias R, et al. Klebsiella pneumoniae and Colistin Susceptibility Testing: Performance Evaluation for Broth Microdilution, Agar Dilution and Minimum Inhibitory Concentration Test Strips and Impact of the "Skipped Well" Phenomenon. Diagnostics (Basel). 2021 Dec; 11(12): 2352.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF Numero di catalogo	o REF	LOT Numero di lotto	IVD Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>	 Fabbricante	 Utilizzare entro
 Limiti di temperatura	 Contenuto sufficiente per <n> saggi	 Consultare le Istruzioni per l'Uso	 Proteggere dalla luce	 Proteggere dall'umidità	

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 4	Aggiornamento del contenuto e del layout	04/2022

Nota: lievi modifiche tipografiche, grammaticali e di formattazione non sono incluse nella cronologia delle revisioni.

