

TSC AGAR BASE

D-CYCLOSERINE ANTIMICROBIC SUPPLEMENT

D-CYCLOSERINE 4-MUP SUPPLEMENT

TSC AGAR – TSC AGAR MUP

Terreno di coltura in polvere, supplementi selettivi e terreno pronto all'uso in flacone, provetta e piastra

1 – DESTINAZIONE D'USO

Per l'isolamento e il conteggio di *Clostridium perfringens* in alimenti, acque e altri materiali.

2 – COMPOSIZIONE

TSC AGAR BASE

FORMULA TIPICA PER LITRO, DOPO DISCIOGLIMENTO IN ACQUA *

Idrolisato pancreatico di caseina	15 g
Peptone di soia	5 g
Estratto di lievito	5 g
Ferro (III) ammonio citrato	1 g
Sodio metabisolfito (Na ₂ S ₂ O ₅) anidro	1 g
Agar	15 g

D-CYCLOSERINE ANTIMICROBIC SUPPLEMENT

(CONTENUTO DELLA FIALA PER 500 ML DI TERRENO)

D-Cicloserina	200 mg
---------------	--------

D-CYCLOSERINE 4-MUP ANTIMICROBIC SUPPLEMENT

(CONTENUTO DELLA FIALA PER 500 ML DI TERRENO)

D-Cicloserina	200 mg
4-metilumbelliferilfosfato (4-MUP)	50 mg

TSC AGAR - PIASTRE PRONTE

TSC Agar Base	1000 mL
D-Cicloserina	400 mg

TSC MUP AGAR - PIASTRE PRONTE

TSC Agar Base	1000 mL
D-Cicloserina	400 mg
4-metilumbelliferilfosfato (4-MUP)	100 mg

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

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

L'intossicazione alimentare causata da *Clostridium perfringens* può verificarsi quando alimenti come carni crude, pollame, zuppe e salse disidratate, verdure crude e spezie vengono cotte e conservate senza essere adeguatamente riscaldate o refrigerate prima di essere servite.¹ Il conteggio di *C. perfringens* nei campioni di cibo svolge un ruolo fondamentale nell'indagine epidemiologica dei focolai di malattie di origine alimentare e a questo scopo sono stati proposti diversi terreni di coltura fin dagli anni Cinquanta.

Il Tryptose Sulfite Cycloserine (TSC) Agar è stato sviluppato da Harmon² utilizzando lo stesso terreno di base dell'agar Shahidi-Ferguson-Perfringens (SFP), ma con 400 mg/L di D-cicloserina in sostituzione alla kanamicina e alla polymixina. Il metodo TSC Agar è stato migliorato da Hauschild eliminando il tuorlo d'uovo e utilizzando piastre di coltura.⁴ TSC Agar, con e senza l'aggiunta di tuorlo d'uovo, è probabilmente il miglior terreno di coltura tra quelli attualmente disponibili per il conteggio di *C. perfringens*.⁵

Il terreno completo TSC Agar con D-cicloserina e senza emulsione di tuorlo d'uovo soddisfa i requisiti della norma ISO 7937⁶ (che sarà sostituita dalla norma ISO 15213-2 in fase di sviluppo)⁷ per i campioni della catena alimentare e della norma ISO 14189⁸ per le acque. Con e senza emulsione di tuorlo d'uovo, TSC Agar soddisfa i requisiti di FDA-BAM¹.

TSC Agar Base integrato con D-cicloserina e 4-metilumbelliferil fosfato semplifica il conteggio di *C. perfringens* soprattutto in presenza di un numero elevato di piccole colonie.⁹

Per l'individuazione di *Clostridium* spp. solfito-riduttore in campioni alimentari con Iron Sulfite Agar, consultare la norma ISO 15213-1.¹⁰

Lidrolizzato pancreatico di caseina e il peptone di soia forniscono azoto, carbonio, minerali e aminoacidi per la crescita microbica. L'estratto di lievito è una fonte di vitamine, in particolare del gruppo B. Il citrato ferrico di ammonio e il metabisolfito di sodio sono indicatori della riduzione del solfito da parte di *C. perfringens*, che produce colonie nere. La D-cicloserina è un antibiotico che inibisce la biosintesi della parete cellulare nei batteri e contribuisce l'isolamento selettivo di *C. perfringens* inibendo la flora contaminante.

La rilevazione della fosfatasi acida si è dimostrata un utile strumento diagnostico per l'identificazione di *C. perfringens*.

C. perfringens può metabolizzare il 4-metilumbelliferil fosfato (MUP) utilizzando l'enzima fosfatasi acida per produrre il 4-metilumbelliferone, che diventa fluorescente se posto sotto una luce ultravioletta a lunga lunghezza d'onda (365 nm).⁹

4A- PREPARAZIONI DEL TERRENO DISIDRATATO

TSC Agar. Sospendere 21 g di TSC Agar Base in 500 mL di acqua purificata fredda. Riscaldare fino a ebollizione con frequente agitazione e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 47-50°C e aggiungere il contenuto di una fiala di D-Cycloserine Antimicrobial Supplement (REF 4240002), ricostituito con 5 mL di acqua purificata sterile. Se necessario, è possibile aggiungere 25 mL di Egg Yolk Emulsion (REF 42111601) al terreno di coltura preraffreddato. Mescolare bene e versare in piastre Petri sterili.





TSC MUP Agar. Sospendere 21 g di TSC Agar Base in 500 mL di acqua fredda purificata. Riscaldare fino a ebollizione con frequente agitazione e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 47-50°C e aggiungere il contenuto di una fiala di D-Cycloserine 4-MUP Supplement (REF 4240049), ricostituita con 5 mL di acqua distillata sterile. Mescolare bene e versare in piastre Petri sterili.

4B- PREPARAZIONI DEL TERRENO IN FLACONE E IN PROVETTA

Liquefare il contenuto del flacone o della provetta in un'autoclave a $100 \pm 2^\circ\text{C}$ o a bagnomaria a temperatura controllata (100°C). In alternativa, i flaconi e le provette possono essere inseriti in un recipiente contenente acqua, che viene posto su una piastra calda e portato a ebollizione. Allentare leggermente il tappo prima del riscaldamento per consentire lo scambio di pressione. Raffreddare a 47-50°C. Ricostituire il contenuto di una fiala di D-Cycloserine Antimicrobic Supplement (REF 4240002) o di D-Cycloserine 4-MUP Supplement (REF 4240049) con 5 mL di acqua purificata sterile e aggiungere a TSC Agar Base nelle seguenti quantità:

Flacone da 100 mL: 1 mL/flacone

Flacone da 200 mL: 2 mL/ flacone

Provetta da 15 mL: 0,15 mL/provetta

Mescolare bene e distribuire in piastre Petri sterili.

5 – CARATTERISTICHE DEL TERRENO

TSC Agar Base

Aspetto della polvere

Fine granulometria omogenea, beige

Aspetto del terreno in provetta e in flacone

giallo, limpido

pH (20-25 °C)

$7,6 \pm 0,2$

D-Cycloserine Antimicrobic Supplement

Aspetto del supplemento liofilizzato

compressa bassa di colore bianco

Aspetto del supplemento ricostituito

soluzione limpida incolore

D-Cycloserine 4-MUP Supplement

Aspetto del supplemento liofilizzato

compressa bassa di colore bianco

Aspetto del supplemento ricostituito

limpido, incolore

6 – MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
TSC Agar Base	Terreno in polvere	4021582	500 g (11,9 L)
D-Cycloserine Antimicrobic Supplement	Supplemento liofilo	4240002	10 flaconi, ciascuno per 500 mL di terreno
D-Cycloserine 4-MUP Supplement	Supplemento liofilo	4240049	10 flaconi, ciascuno per 500 mL di terreno
TSC Agar	Piastre pronte all'uso	542158	2 x 10 piastre \varnothing 90 mm
TSC Agar	Piastre pronte all'uso	492158	3 x 10 piastre \varnothing 55 mm
TSC Agar MUP	Piastre pronte all'uso	492158X	3 x 10 piastre \varnothing 55 mm
TSC Agar Base	Provette pronte all'uso	552158B	20 x 15 mL
TSC Agar Base	Flaconi ponti all'uso	5121582	6 x 100 mL
TSC Agar Base	Flaconi ponti all'uso	5121583	6 x 200 mL

7 – MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse, tamponi e pipette sterili, incubatore e attrezzature di laboratorio necessarie, beute, piastre sterili, generatori di atmosfera controllata e giare, membrane filtranti, terreni di coltura e reagenti ausiliari.

8 – CAMPIONI

Acque, alimenti e mangimi. Per la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, seguire le buone pratiche di laboratorio e fare riferimento agli standard e alle normative internazionali applicabili.⁶⁻⁸

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

Conteggio di *C. perfringens* negli alimenti con TSC Agar (ISO/DIS 15213-2)⁷

- Preparare il campione, la sospensione iniziale e le diluizioni, in conformità alla norma internazionale specifica per il prodotto in questione.
- Se si intende contare solo le spore, riscaldare la serie di diluizioni decimali a 80°C in un bagno d'acqua per 10 minuti \pm 1 minuto.
- Trasferire con pipette sterili 1 mL del campione in esame (se liquido) o 1 mL della sospensione iniziale e 1 mL di ciascuna diluizione decimale, in duplice copia, al centro di piastre Petri vuote.
- Versare 12-15 mL di TSC Agar senza tuorlo d'uovo in ciascuna piastra da 90 mm e mescolare bene con l'inoculo. Versare da 45 mL a 50 mL per le piastre Petri da 140 mm.
- Mescolare accuratamente l'inoculo con il terreno di coltura ruotando le piastre Petri.
- Dopo la completa solidificazione, versare circa 5 mL di terreno per le piastre Petri da 90 mm o 10 mL per quelle da 140 mm come copertura, per evitare lo sviluppo di colonie diffuse sulla superficie del terreno.
- Lasciare solidificare e incubare in giare per anaerobiosi o altri contenitori adatti e incubare a 37°C per 20 ± 2 ore. Un'incubazione più lunga può causare un eccessivo annerimento delle piastre.
- Contare le colonie tipiche nelle piastre contenenti meno di 150 colonie sospette (piastre Petri da 90 mm) o meno di 360 colonie (piastre Petri da 140 mm).
- Per confermare la presenza di *C. perfringens*, scegliere una delle due tecniche seguenti:
Test della fosfatasi acida (REF192010) o SIM agar test (REF 402036).

Conteggio di *C. perfringens* negli alimenti con TSC MUP Agar¹¹

- Trasferire con pipette sterili 0,1 mL del campione in esame (se liquido) o 0,1 mL della sospensione iniziale e 0,1 mL di ciascuna diluizione decimale, in duplice copia, sulla superficie delle piastre TSC 4 MUP Agar.
- Incubare in giare per anaerobiosi o in altri contenitori adatti e incubare a 44°C per 22 ± 2 ore.
- Contare le colonie fluorescenti osservate sotto la lampada di Wood (360 nm) sulle piastre contenenti da 15 a 150 colonie caratteristiche.
- Confermare le colonie sospette con il test della catalasi (-) e con il CAMP test invertito (+).



**Conteggio di *C. perfringens* nelle acque con TSC Agar (ISO 14189)⁸**

1. Filtrare un volume misurato di campione, o una sua diluizione, attraverso una membrana con pori di 0,45 µm, dimensione sufficiente a trattenere le spore del clostridio.
2. Con tecnica asettica, posizionare il filtro a membrana usato per raccogliere il campione d'acqua sulla superficie dell'agar, evitando la formazione di bolle d'aria tra il filtro e la superficie dell'agar.
3. Incubare TSC Agar in anaerobiosi a 44 ± 1°C per 21 ± 3 ore.

10 – LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica e registrare le caratteristiche morfologiche e cromatiche specifiche delle colonie.

Su TSC Agar, *C. perfringens* produce solitamente colonie nere o grigio-giallo-brune come risultato della riduzione del solfito a solfuro.

Su TSC MUP Agar, *C. perfringens* produce solitamente colonie nere o grigio-giallo-brune, fluorescenti se osservate sotto la lampada di Wood.

Per una spiegazione completa dei criteri e dei metodi di identificazione, consultare i riferimenti citati.^{1,6-8,11}

11 – CONTROLLO QUALITÀ DELL'UTILIZZATORE

Ciascun lotto del prodotto qui descritto è rilasciato alla vendita dopo l'esecuzione del controllo qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. È comunque facoltà dell'utilizzatore eseguire un proprio controllo di qualità con modalità in accordo alle normative vigenti in materia, nel rispetto dei requisiti di accreditamento e dell'esperienza del Laboratorio. Di seguito sono elencati alcuni ceppi utili per il controllo qualità.⁵

CEPPO DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>C. perfringens</i> ATCC 13124	37°C/ 18-24 H / AN	crescita, colonie nere (TSC MUP Agar: fluorescente sotto lampada di Wood)
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	37°C/ 18-24 H / AN	totalmente inibito

AN: incubazione in anaerobiosi; ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection

12- CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo per ogni lotto di TSC Agar Base disidratato con e senza D-Cycloserine Antimicrobial Supplement, D-Cycloserine 4-MUP Supplement, e di piastre pronte all'uso di TSC Agar e TSC MUP Agar è testato per la produttività e la selettività con ceppi target e non target.

La produttività è testata mediante tecnica quantitativa per inclusione o mediante tecnica di filtrazione su membrana con il ceppo target *C. perfringens* ATCC 13124 con incubazione a 37°C e 44°C per 20 ore.

La selettività è testata con il metodo Miles-Misra modificato con i seguenti ceppi non target: *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. mirabilis* ATCC 10005. Inoltre, *C. sporogenes* ATCC 19404 è testato con la tecnica delle diluizioni ad estinzione.

TSC Agar senza D-cicloserina è testato con il metodo quantitativo su piastra con *C. perfringens* ATCC 13124 e con metodo semiquantitativo eometrica con *E. coli* ATCC 25922.

In TSC Agar Base integrato con D-cicloserina o D-cicloserina e MUP, con tutti i metodi di inoculo e incubazione, *C. perfringens* cresce con colonie nere (fluorescenti sotto la lampada di Wood per TSC MUP Agar) e l'indice di produttività misurato è sempre superiore a 0,7. *B. subtilis* è totalmente inibito, mentre *E. coli*, *P. mirabilis* e *P. aeruginosa* sono parzialmente inibiti.

In TSC Agar senza D-cicloserina, *C. perfringens* cresce con colonie nere ed *E. coli* cresce con colonie incolori.

13 – LIMITI DEL METODO

- Le colonie nere devono essere confermate come *C. perfringens* mediante test appropriati.

14 – PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno di coltura e i supplementi qui descritti sono destinati al controllo microbiologico e sono per uso professionale; devono essere usati in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni
- Il terreno di coltura e i supplementi devono essere utilizzati in associazione secondo le indicazioni descritte. Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni.
- I terreni disidratati ed i supplementi contenenti antibiotici devono essere maneggiati con adeguate protezioni. Prima dell'uso, consultare le schede 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.
- Prestare attenzione all'apertura dei flaconi e delle provette con tappo a vite per evitare lesioni dovute alla rottura del vetro. Prestare attenzione all'apertura dell'anello metallico dei supplementi per evitare lesioni.
- Quando si utilizza una piastra riscaldante e/o un bagnomaria, far bollire a sufficienza per sciogliere tutto il terreno di coltura.
- Indossare guanti di protezione dal calore durante la liquefazione del terreno in flacone. Non mettere le beute calde in un bagno di ghiaccio o in acqua fredda per accelerare il raffreddamento, poiché ciò potrebbe causare crepe nel vetro.
- Il tempo necessario per la completa liquefazione del terreno in flacone può variare notevolmente e dipende dalla temperatura effettiva del dispositivo di riscaldamento, dalla sua potenza, dalle dimensioni e dal volume della bottiglia.
- Una volta liquefatto, il terreno in flacone non può essere solidificato e disciolto una seconda volta.
- I flaconi e le provette pronte all'uso sono soggette a sterilizzazione terminale in autoclave.
- Il supplemento è sterilizzato mediante filtrazione a membrana.
- Ogni piastra di questo terreno di coltura è monouso.
- Le piastre pronte all'uso non sono da considerarsi un "prodotto sterile" in quanto non sono soggette a sterilizzazione terminale, ma un prodotto con biocontaminazione controllata, entro i limiti delle specifiche riportate sul Certificato di Controllo di Qualità.
- Tutti i campioni di laboratorio devono essere considerati infettivi.
- Evitare la contaminazione dell'ambiente di laboratorio con il terreno di coltura, i supplementi ed i ceppi microbici





- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire i terreni ed i supplementi non utilizzati ed i terreni inoculati con i campioni o con ceppi microbici e sterilizzati, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare i prodotti qui descritti come principi attivi per preparazioni farmaceutiche o come materiale per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- I Certificati d'Analisi e le Schede di Sicurezza sono disponibili sul sito www.biolifeitaliana.it.
- Le informazioni contenute in questo documento sono state definite al meglio delle nostre conoscenze e capacità e rappresentano una linea guida al corretto impiego dei prodotti, 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**Piastre pronte all'uso**

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a +2°C / +8°C al riparo della luce. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. Le piastre estratte dal sacchetto di plastica possono essere utilizzate entro 7 giorni. Eliminare se vi sono segni di deterioramento (es. contaminazione microbica, disidratazione, restringimenti o screpolature del terreno, colore atipico, eccesso di condensa).

Flaconi e provette pronte all'uso

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a +2°C / +8°C al riparo della luce. In queste condizioni i flaconi sono validi fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. I flaconi estratti dal confezionamento secondario possono essere utilizzati sino alla data di scadenza. I flaconi aperti devono essere usati immediatamente. Prima dell'uso, controllare la chiusura e l'integrità del tappo a vite. Eliminare i flaconi con segni di deterioramento (es. contaminazione microbica, torbidità anormale, colore atipico).

Terreno di coltura in polvere

Dopo il ricevimento, conservare a +10°C /+30°C al riparo della luce in luogo asciutto. In queste condizioni il prodotto è valido sino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. 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 (es. modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi).

Supplementi liofilizzati

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a +2°C / +8°C al riparo della luce. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. Una volta aperto il flacone e ricostituito il liofilizzato, la soluzione ottenuta deve essere usata immediatamente. Prima dell'uso esaminare il liofilizzato e il prodotto ricostituito per rilevare segni evidenti di deterioramento (es. contaminazione, colore alterato o altra caratteristica anomala).

L'utilizzatore è responsabile del processo di preparazione e di controllo dei terreni in laboratorio e della validazione della loro shelf life, in funzione della tipologia e condizioni di conservazione applicate (temperatura e confezionamento). Secondo la norma ISO 14189⁸, le piastre di TSC Agar con D-cicloserina preparate dall'utente possono essere conservate a +2°C /+8°C per un massimo di 7 giorni; il terreno di base (senza D-cicloserina) può essere conservato a +2°C /+8°C per un massimo di 4 settimane.

16- BIBLIOGRAFIA

1. U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM). Chapter 16: Clostridium perfringens.
2. Harmon SM, Kautter DA, Peeler JT. Improved medium for enumeration of Clostridium perfringens Appl Microbiol 1971 Oct;22(4):688-92.
3. Shahidi SA, Ferguson AR. New quantitative, qualitative, and confirmatory media for rapid analysis of food for Clostridium perfringens. Appl. Microbiol. 1971; 21:500-506.
4. Hauschild AH, Hilsheimer R. Evaluation and modifications of media for enumeration of Clostridium perfringens. Appl Microbiol 1974 Jan;27(1):78-82.
5. Mead GC. Selective and differential media for Clostridium perfringens. Int J Food Microbiol 1985; 2:89-98
6. ISO 7937:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of Clostridium perfringens -- Colony-count technique
7. ISO/DIS 15213-2 6b Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of Clostridium spp. — Part 2: Enumeration of Clostridium perfringens by colony-count technique
8. ISO 14189:2013 Water quality — Enumeration of Clostridium perfringens — Method using membrane filtration
9. Adcock PW, Saint CP. Rapid Confirmation of Clostridium perfringens by Using Chromogenic and Fluorogenic Substrates. Appl Environ Microbiol. 2001 Sep; 67(9): 4382–4384.
10. ISO 15213-1:2023. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of Clostridium spp. Part 1: Enumeration of sulfite-reducing Clostridium spp. by colony-count technique.
11. Manuel Suisse des Denrées Alimentaires (MSDA). Chapitre 56, Microbiologie. Juillet 2000

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF Numero di catalogo	LOT Numero di lotto	Fabbricante	Utilizzare entro	Proteggere dall'umidità	Fragile, maneggiare con cura
Limiti di temperatura	Contenuto sufficiente per <n> test	Consultare le Istruzioni per l'Uso	Lato superiore	Proteggere dalla luce	Monouso

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 8	Aggiornamento del contenuto e del layout	03/2023
Revisione 9	Revisione del contenuto	06/2024

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

