

Le caratteristiche degli *Escherichia coli* produttori di Shiga tossina (STEC) ed i principali quadri clinici di infezione nell'uomo

Riccardo Mazzocca¹, Stefano Morabito², Mario Giordano³, Maria Chironna⁴, Daniela Loconsole⁴

¹Università degli studi dell'Aquila, L'Aquila

²Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

³Azienda Ospedaliera Giovanni XXIII, Bari

⁴Università degli Studi di Bari Aldo Moro, Bari

Indice

Che cos'è uno STEC? Definizione e descrizione delle caratteristiche microbiologiche; caratteristiche differenziali con altri patogruppi di E.coli diarreagenici e nomenclatura	1
Escherichia coli: caratteristiche generali ed ecologia	2
Plasticità genomica di E. col	3
Classificazione dei ceppi patogeni di <i>E. coli</i>	4
<i>E. coli</i> produttori di Shiga tossine (STEC)	7
STEC agenti di zoonosi, popolazione target, principali fattori di rischio. Breve inquadramento storico della scoperta degli STEC come agenti di malattia nell'uomo	9
Inquadramento storico	9
Popolazione target e fattori di rischio	9
Storia naturale delle malattie associate a STEC: quadri clinici, evoluzione, prognosi, complicanze a lungo termine, stagionalità	11

Sorveglianza clinica ed epidemiologica delle infezioni da STEC nella popolazione pediatrica	13
Notifica	15
Il modello del protocollo di sorveglianza sindromica delle gastroenteriti emorragiche in età pediatrica: la Lombardia e la Puglia come esempio di best practice	16
Bibliografia	19

Che cos'è uno STEC? Definizione e descrizione delle caratteristiche microbiologiche; caratteristiche differenziali con altri patogruppi di *E.coli* diarreagenici e nomenclatura

***Escherichia coli*: caratteristiche generali ed ecologia**

Escherichia coli è una specie di batteri Gram negativi anaerobi facoltativi, in grado di tollerare numerosi stress ambientali, quali variazioni di temperatura, di pH, e disponibilità di nutrienti (1,2).

Ceppi di *E. coli* sono ubiquitari, abbondanti nel tratto gastrointestinale di molti mammiferi, compreso l'uomo, ma anche di rettili e uccelli. In seguito al rilascio nell'ambiente riescono a sopravvivere nel suolo, nel sedimento, sulla superficie delle alghe, e nell'acqua, mantenendo la loro popolazione abbastanza a lungo da adattarsi a tali ambienti e divenire "naturalizzati" (1-3).

Nell'uomo, poche ore dopo la nascita, *E. coli* colonizza il tratto gastrointestinale dove si insedia a livello dell'intestino crasso, in particolare nel cieco e nel colon, e risiede nello strato di muco che ricopre le cellule epiteliali lungo tutto il tratto intestinale (4).

Una volta riversate nel lume intestinale insieme alla componente mucosale degradata le cellule batteriche di *E. coli* sono escrete attraverso le feci (5). Nel tratto intestinale, *E. coli* instaura un rapporto di commensalismo-mutualismo con una funzione prevalentemente benefica per l'ospite: quest'ultimo infatti fornisce al batterio un costante apporto di nutrienti, un ambiente stabile e protezione da diversi stress ambientali e, in cambio, *E. coli*

previene la colonizzazione dell'intestino dell'ospite da parte di molte specie patogene attraverso diversi meccanismi, tra cui la produzione di batteriocine, contribuendo al mantenimento dell'equilibrio tra le specie che compongono il microbiota intestinale (5, 6).

Nel corso dell'evoluzione, tuttavia alcune popolazioni di *E. coli* hanno evoluto la capacità di causare delle forme morbose, grazie all'abilità di acquisire DNA esogeno da altri microrganismi: il guadagno di nuove funzioni e di fattori di virulenza ha consentito loro di determinare un ampio spettro di malattie, sia negli animali che nell'uomo. Tali infezioni possono limitarsi al distretto intestinale, come nel caso delle sindromi enteriche/diarreageniche, o disseminarsi in altri distretti dell'organismo, come nel caso di infezioni del tratto urinario, sepsi e meningiti anche neonatali (7,8).

Plasticità genomica di *E. coli*

Appare evidente che l'abilità di *E. coli* nel colonizzare un così ampio spettro di ospiti, distretti corporei e nicchie ecologiche risiede nella straordinaria plasticità del suo genoma, ossia nella capacità di scambiare materiale genetico con altri batteri, anche appartenenti ad altre specie, attraverso il "trasferimento genico orizzontale". Tale meccanismo è mediato dall'azione di "elementi genetici mobili", ovvero molecole di DNA capaci di integrarsi nel cromosoma batterico, come batteriofagi, trasposoni e isole di patogenicità, oppure capaci di replicarsi autonomamente all'interno della cellula batterica, come i plasmidi. Gli elementi genetici mobili, per definizione, sono capaci di auto-mobilizzarsi e di trasmettere parte dell'informazione genetica da una cellula batterica ad un'altra per coniugazione o seguendo dei cicli di integrazione-escissione-integrazione (9).

Oltre ai circa 2.000 geni "core" che codificano funzioni essenziali per il mantenimento della cellula batterica e che sono condivisi tra tutti i ceppi appartenenti alla specie *E. coli*, differenti popolazioni di batteri appartenenti a questa specie possono differire per molte migliaia di basi di DNA acquisito per via orizzontale. Questo DNA esogeno appartiene ad un pool genico o "pangenoma" di oltre 22.000 geni, definiti geni "accessori" in quanto codificano funzioni che conferiscono un vantaggio selettivo in determinate

condizioni ambientali, tra cui geni che conferiscono resistenza ad antibiotici e composti tossici, geni che codificano nuove funzioni metaboliche e fattori di virulenza (10-12). I diversi gruppi patogeni di *E. coli* sono caratterizzati da specifici profili genici costituiti da determinanti acquisiti dal pangenoma che vengono stabilizzati e determinano il successo evolutivo della specie.

Classificazione dei ceppi patogeni di *E. coli*

I ceppi patogeni vengono divisi, in due principali categorie, sulla base del distretto corporeo che colonizzano o dello specifico meccanismo di patogenesi utilizzato. Queste sono gli *E. coli* patogeni extra-intestinali o ExPEC (Extraintestinal pathogenic *E. coli*) e gli *E. coli* diarreegenici o DEC (4).

Le infezioni causate dai ceppi ExPEC sono comuni a tutte le età e possono coinvolgere potenzialmente ogni organo o sito anatomico al di fuori del tratto gastrointestinale, come sangue, polmoni, sistema nervoso centrale e tratto urinario. Per provocare tali infezioni i ceppi ExPEC si servono di combinazioni di diversi fattori di virulenza, quali fimbrie, pili, sistemi di acquisizione del ferro e tossine (13,14). I ceppi ExPEC comprendono a loro volta diverse sottopopolazioni, tra cui si identificano i ceppi di *E. coli* uropatogeni (Uropathogenic *E. coli*; UPEC), che rappresentano la prima causa di infezioni urinarie al mondo, incluse cistiti e pielonefriti, ceppi associati a setticemie (SEPEC) ed *E. coli* associati a meningiti neonatali (Neonatal meningitis-associated *E. coli*; NMEC), i quali sono considerati i principali agenti responsabili di meningite batterica neonatale (15, 16).

Il gruppo di ceppi DEC è quello più numeroso a cui appartengono almeno sei differenti sottogruppi o patotipi i quali, sulla base dei determinanti di virulenza acquisiti nel corso della loro evoluzione, si caratterizzano per il diverso meccanismo di patogenesi e conseguentemente per la diversa sintomatologia che causano nei pazienti colpiti (7, 9).

I ceppi di *E. coli* enteropatogeni (EPEC) rappresentano il primo patotipo DEC descritto in seguito all'associazione di un ceppo di *E. coli* a epidemie infantili di diarrea, nel Regno Unito nel 1943 (17) (figura 1a). I ceppi EPEC rappresentano ad oggi una delle principali cause di diarrea infantile nei paesi

a basso reddito, con episodi acuti che a volte si protraggono nel tempo (4). Il meccanismo di patogenesi degli EPEC dipende essenzialmente dalla loro capacità di aderire efficientemente alla mucosa intestinale dell'uomo, utilizzando dei pili e causando la cosiddetta lesione "attaching and effacing" (A/E) a livello degli enterociti. Questo meccanismo è governato da fattori di virulenza codificati dall'isola di patogenicità LEE (Locus of Enterocyte Effacement), la quale è stata identificata anche in alcuni ceppi STEC (4, 18).

Il patotipo EPEC è a sua volta suddiviso in due sottogruppi: gli *E. coli* enteropatogeni tipici (tEPEC) e gli *E. coli* enteropatogeni atipici (aEPEC). I tEPEC sono responsabili di infezioni che avvengono per contatto interumano attraverso la via oro-fecale. Possiedono un grande plasmide di virulenza chiamato pEAF (EPEC Adherence Factor), il quale trasporta geni che regolano il meccanismo A/E, e il bfp locus, ovvero il locus genico che codifica per i pili di tipo IV e mediano l'adesione iniziale alle cellule epiteliali dell'ospite e ad altre cellule batteriche (19). Gli aEPEC possiedono invece un plasmide di virulenza diverso dal pEAF, che trasporta geni che codificano fattori di virulenza quali il gene ehx codificante la enteroemolisina (E-hly).

I ceppi di *E. coli* enterotossigenici (ETEC) rappresentano la causa principale di diarrea acquosa infantile nei paesi a basso reddito, nonché il principale agente eziologico della cosiddetta "diarrea del viaggiatore" (7) (figura 1c). La colonizzazione del tratto gastrointestinale da parte degli ETEC avviene grazie all'espressione di un'ampia gamma di fattori di colonizzazione (CFA; Colonization Factor Antigens), distinti sulla base della loro struttura e che includono adesine fimbriali e non fimbriali, i quali si legano a specifici recettori sulla membrana degli enterociti (9, 20). La patogenicità degli ETEC, inoltre, si esplica attraverso la produzione di enterotossine termostabili (ST; heat-stable toxin) o termolabili (LT; heat-labile toxin), codificate da geni trasportati da plasmidi (7,9). Le varianti di CFA ed enterotossine prodotte dagli ETEC sono specie-specifiche e consentono a questi ceppi di colonizzare sia l'intestino umano che animale, dopo ingestione di acqua o alimenti di origine vegetale contaminati (21).

I ceppi appartenenti al patotipo EAEC (Enteroaggregative *E. coli*) aderiscono all'ileo terminale e al colon con un pattern di aggregazione noto come "stacked-brick", ovvero a mattoni impilati, in seguito definito pattern ad "aderenza aggregativa" (AA) (22) (figura 1d). Questo meccanismo è mediato da fimbrie (AAF/I-AAF/V), i cui geni sono trasportati dal plasmide pAAs insieme ad altri fattori che favoriscono l'adesione e che codificano tossine (23). Le infezioni da EAEC avvengono per trasmissione persona-persona e attraverso l'ingestione di acqua e cibi contaminati (24).

La patogenesi delle infezioni causate dai ceppi di *E. coli* Enteroinvasivi (EIEC) è molto simile a quella causata dai ceppi di Shigella; infatti, i ceppi appartenenti a queste due specie sono geneticamente e fenotipicamente correlati (figura 1e). In particolare, i ceppi di EIEC e Shigella condividono un grande plasmide di virulenza, chiamato pInv, il quale conferisce la capacità di invadere e distruggere le cellule epiteliali dell'intestino crasso distale. Esso trasporta i geni ipaA-ipaH, che mediano il meccanismo di invasione (4). Dopo la moltiplicazione intracellulare, gli EIEC possono invadere le cellule epiteliali adiacenti, sfruttando un movimento direzionale che coinvolge il citoscheletro dell'enterocita: in tal caso provocano forti coliti infiammatorie e diarrea acquosa, in alcuni casi anche emorragica (7). La via di trasmissione principale è quella oro-fecale nell'uomo, tramite contatto diretto con individui affetti, ma è stata descritta anche la trasmissione mediata da alimenti (25).

I ceppi DAEC (Diffusely adherent *E. coli*) prendono il nome dal pattern di infezione "diffuso e adeso" (DA) che questi ceppi mostrano su monostrato di cellule epiteliali, di cui possono ricoprire l'intera superficie (figura 1f). Tale meccanismo è innescato dalla presenza di una serie di adesine fimbriali e afimbriali (Afa), appartenenti alla famiglia Afa/Dr. Queste si legano a un componente della membrana plasmatica dell'enterocita che funge eccezionalmente da recettore e inducono un effetto citopatico caratterizzato dallo sviluppo di lunghe estensioni cellulari che si avvolgono intorno al batterio (4, 26). Numerosi studi hanno associato i DAEC a infezioni negli adulti e nei bambini di età superiore ai 12 mesi (27,28).

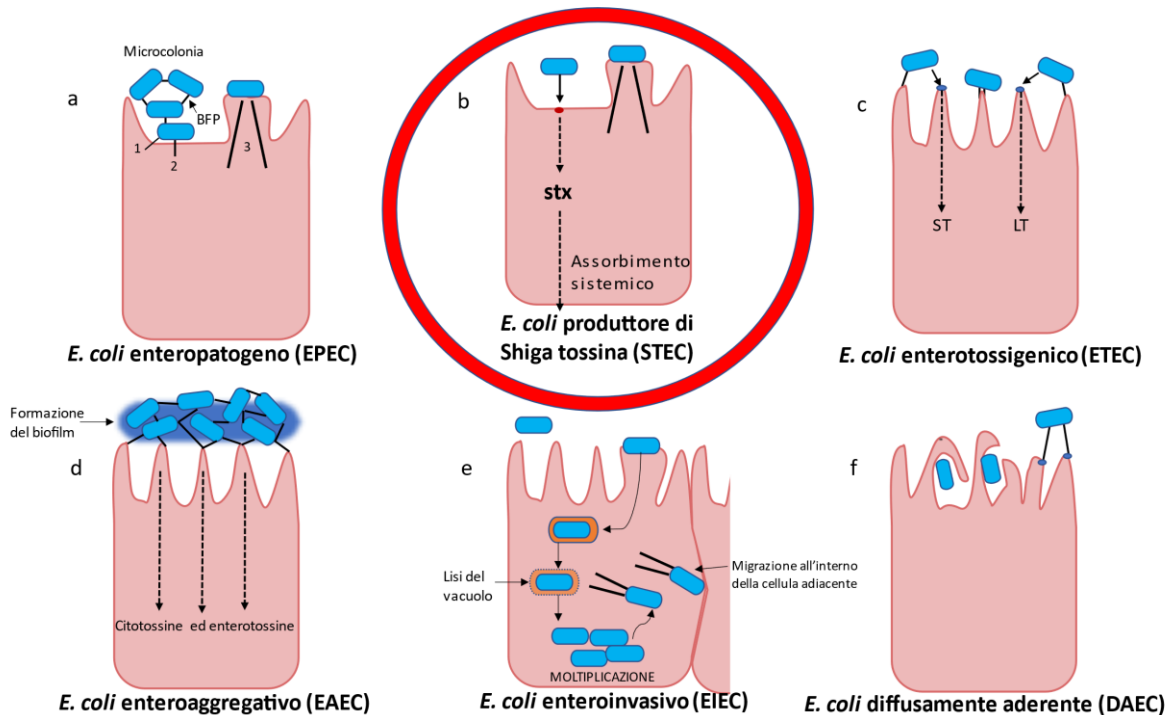


Figura 1. Rappresentazione dei meccanismi di patogenesi dei DEC. Le figure a, b, c, d, e ed f mostrano le diverse modalità di adesione/colonizzazione dell'epitelio intestinale utilizzate dai diversi ceppi di *E. coli* diarrogenici. A questi eventi possono seguire secrezione e internalizzazione di tossine e/o di vari effettori con induzione di cascate di trasduzione del segnale che culminano con un effetto dannoso per l'ospite. *Nature Reviews, Pathogenic Escherichia coli* (Kaper et al. 2004).

***E. coli* produttori di Shiga tossine (STEC)**

I ceppi di *E. coli* produttori di Shiga tossine devono il nome alla produzione di potenti citotossine, le Shiga tossine, di cui possono produrre due principali varianti antigeniche:

- la Stx1 che è identica alla tossina prodotta da *Shigella dysenteriae*, tranne che per un amminoacido della subunità A, distinta nei tre sottotipi Stx1a, Stx1c e Stx1d;
- la Stx2, distinta in più di undici sottotipi e correlata a una maggior severità dell'infezione da STEC (29).

Alcuni ceppi STEC esprimono un solo tipo di tossina, mentre altri esprimono una combinazione di varianti di una o di entrambi i tipi (9).

I due tipi di Shiga tossine sono tradotti a partire dai geni stx1 ed stx2 che

localizzano su due diversi batteriofagi lambdoidi (9,30). I fagi che portano i geni codificanti le Shiga tossine sono elementi genetici mobili trasportati dal batterio integrati nel cromosoma in uno stato lisogenico. L'attivazione del ciclo litico, dovuta ad esempio ad un trattamento antibiotico, induce il fago a infettare nuovi ospiti, incrementando la produzione della tossina stessa (31, 32)

In seguito all'ingestione, i ceppi STEC superano l'ambiente dello stomaco grazie all'utilizzo di diversi meccanismi di acido-resistenza, i quali consentono loro di tollerare anche i processi di fermentazione utilizzati nell'industria alimentare per la produzione e la conservazione di molti alimenti, come salumi o yogurt (33)

Dopo aver superato la barriera gastrica, i ceppi STEC raggiungono l'intestino dove superano la competizione con gli altri microrganismi componenti il microbiota.

Molti ceppi STEC utilizzano un meccanismo di adesione alla mucosa intestinale tale da sovvertire la funzionalità dell'enterocita e causare una lesione istopatologica nota come "attaching and effacing" (A/E), presente anche negli EPEC, la quale richiede tre eventi principali:

- l'iniziale adesione del batterio alla cellula ospite;
- la cancellazione dei microvilli localizzati all'area di attacco del batterio;
- la formazione di strutture a piedistallo (9, 33).

Questo tipo di meccanismo è geneticamente governato da una grossa isola di patogenicità (PAI; Pathogenicity island) definita LEE (Locus of Enterocyte Effacement) molto simile a quella descritta nei ceppi EPEC che codifica una proteina chiave nel processo di adesione all'enterocita: l'intimina.

Questa è una proteina che si inserisce nella membrana esterna del batterio e si lega ad alta affinità al suo recettore Tir, anch'esso prodotto dal Locus LEE.

La lesione A/E non rappresenta l'unico meccanismo utilizzato dai ceppi STEC per colonizzare l'intestino. Infatti, la natura mobile degli elementi genetici che mobilizzano i determinanti di virulenza consente ai ceppi di *E. coli* di

coniugare l'assetto dei geni di adesione/colonizzazione di qualunque patotipo di *E. coli* e la capacità di produrre le Shiga tossine, causando l'emergenza di ceppi con caratteristiche trans-patotipo e infezioni con uno spettro di sintomi molto ampio.

Una volta stabilitosi nell'intestino, il ceppo STEC elabora una o più Shiga tossine che sono poi mobilizzate per trasporto retrogrado verso il torrente circolatorio nei vasi della lamina basale. In seguito al suo assorbimento da parte dell'epitelio intestinale, la tossina riesce a passare in forma intatta nel circolo sanguigno e a raggiungere gli altri organi target in cui è espresso il suo recettore (Gb3), in particolare a livello delle cellule endoteliali dei vasi della microvascolatura del glomerulo del rene, provocando danni sia localizzati, con infiammazione renale dovuta all'induzione di citochine e chemochine, che sistemici (4, 34).

STEC: popolazione target, principali fattori di rischio. Breve inquadramento storico della scoperta degli STEC come agenti di malattia nell'uomo

Inquadramento storico

L'identificazione degli *E. coli* produttori di Shiga tossina (STEC) come agenti causali della Sindrome Emolitico Uremica (SEU) risale al 1983 quando Prof. Mohammed Karmali insieme alla sua equipe riuscì a collegare alcuni casi sporadici di SEU (che, come entità patologica, era già stata descritta da Von Gasser nel 1955 (35)) all'effetto di citotossine di *E. coli* presenti nelle feci dei casi di SEU analizzati (36). Si scoprì che questo patogeno produceva una particolare tossina che fu chiamata Verocitotossina, in quanto aveva uno spiccato tropismo e tossicità per le cellule Vero (linea cellulare ottenuta da cellule epiteliali renali di cercopiteco grigioverde). Nello stesso anno, Dott. O'Brien insieme a suoi collaboratori riuscì a purificare la tossina prodotta un ceppo di *E. coli* O157:H7(30). Questa tossina era molto simile a quelle prodotte da *Shigella dysenteriae*, patogeno associato a dissenteria e diarrea emorragica e per tale motivo fu denominata Shiga tossina.

Popolazione target e fattori di rischio

Per quel che riguarda la suscettibilità all'infezione e la gravità della malattia, concorrono diversi fattori di rischio relativi sia alle caratteristiche del patogeno sia alle caratteristiche intrinseche e abitudini dell'ospite. L'età ha un ruolo importante nello sviluppo delle malattie associate a STEC e della loro gravità. In particolare, rappresenta il principale fattore di rischio per lo sviluppo di complicanze più gravi quali la SEU: le fasce d'età maggiormente suscettibili per SEU sono quelle dell'infanzia, considerando in particolare i bambini <5anni (soprattutto nella fase post-svezzamento), e quelle più anziane over 65. La popolazione adulta è quella meno colpita da patologia sintomatica. È inoltre ampiamente documentata l'esistenza di infezioni asintomatiche da STEC ed anche la condizione di portatore asintomatico, talvolta anche di lunga durata. Oltre all'età, va considerato anche lo stato di salute del soggetto. Esistono infatti alcuni fattori che favoriscono l'infezione, tra i quali una scarsa acidità gastrica e uno stato di compromissione del sistema immunitario. Condizioni di stress ed altre caratteristiche genetiche intrinseche dell'ospite sono inoltre stati ipotizzati come fattori di rischio per lo sviluppo della SEU. Tra i fattori comportamentali, diversi studi hanno confermato che alcune abitudini possono rappresentare fattori di rischio. Tra questi possiamo trovare il consumo di hamburger e carni bovine poco cotte, consumare pasti in ristoranti o fast-food, vivere o lavorare o visitare allevamenti di bovini, l'ingestione di acque superficiali non trattate, attività ricreative come nuotare in acque contaminate, il contatto con feci animali e il consumo di latte crudo (37).

Storia naturale delle malattie associate a STEC: quadri clinici, evoluzione, prognosi, complicanze a lungo termine, stagionalità

Il classico quadro clinico con cui esordisce e si manifesta la infezione gastroenterica da STEC non ha elementi clinici e laboratoristici di rilievo che consentano di sospettare il ruolo di questo agente patogeno che tra l'altro, non è tra quelli più frequentemente coinvolto nella eziologia di questa

malattia. Infatti, in particolare in età pediatrica, predominano le diarree da infezioni virale

(norovirus, adenovirus e rotavirus) e tra quelle di origine batterica sono più frequentemente coinvolti il *Campylobacter* e le *Salmonelle*.

Nelle forme da STEC, classicamente, all'incirca dopo tre giorni dalla ingestione di alimenti contaminati e preceduto da algie addominali di intensità variabile, ciò che domina l'esordio di tale patologia è la diarrea che, più frequentemente di quanto accade nelle altre diarree infettive, può avere da subito o a distanza di uno-due giorni dall'esordio clinico, una caratteristica clinica di rilievo: la presenza di sangue. È cioè, nella maggioranza dei casi, una gastroenterite emorragica (GEE o BD= Bloody Diarrhea degli autori anglosassoni).

La diarrea, anche quando è ad impronta emorragica, è raramente associata a vomito (più caratteristico delle gastroenteriti virali da Rotavirus o Norovirus) e a febbre ma, nonostante l'assenza di altri segni di accompagnamento, esso determina almeno nel 50% dei casi ed in particolare nei bambini di età inferiore a 5 anni, una certa compromissione dello stato generale con malessere, impossibilità ad alimentarsi ed intensa astenia, tanto maggiore quanto più frequenti sono le scariche di feci muco-emorragiche.

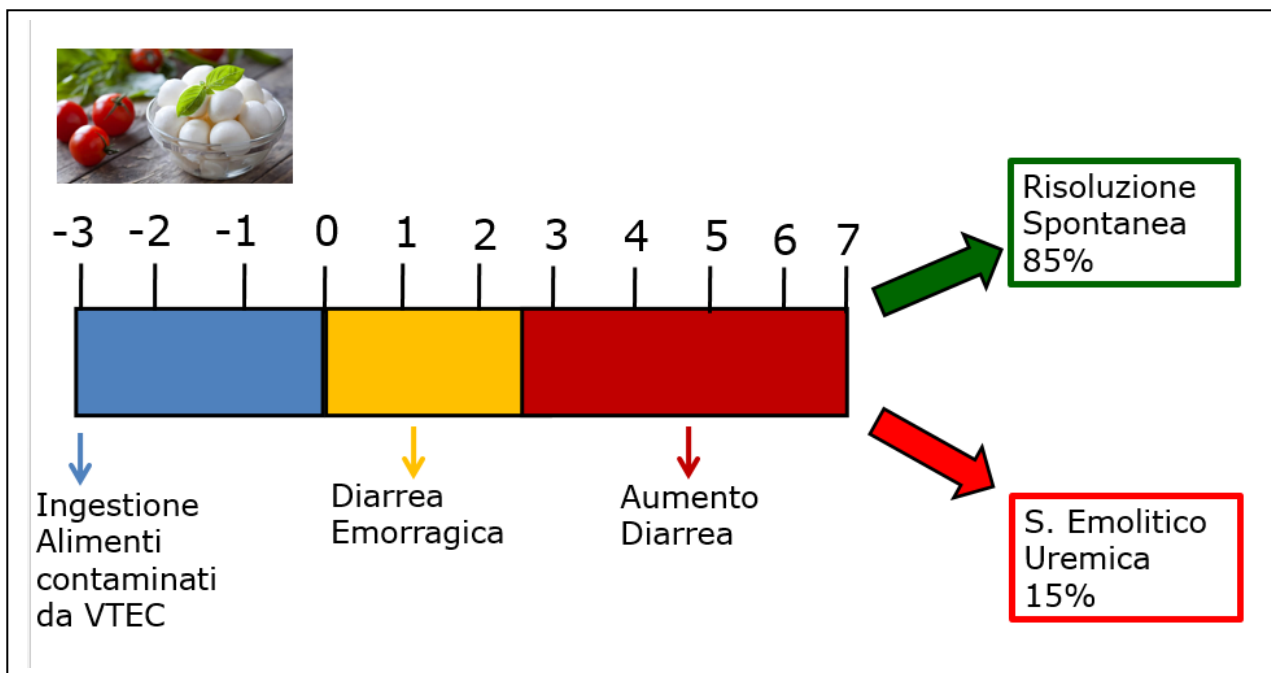


Fig.3 Storia naturale della malattia (Freedman et al.).

La GEE da STEC non è una malattia esclusiva dell'infanzia per quanto i bambini ne siano più frequentemente affetti rispetto alla popolazione adulta ma, allo stesso modo, anche nell'adulto non ci sono segni "predittivi" per individuare nello STEC l'agente eziologico responsabile della GEE.

L'entità del sanguinamento (da striature ematiche ad aspetto muco-sanguinolento su feci, non formate, liquide o semiliquide, sino ad emissione di feci francamente emorragiche) preoccupa il paziente e, nell'età pediatrica, i genitori. In presenza di compromissione delle condizioni generali o per la presenza di scariche alvine ripetute a breve intervallo di tempo nell'arco di poche ore, si ricorre al medico di medicina generale o, nel caso dei bambini, al pediatra di famiglia o al Pronto soccorso pediatrico.

Nei casi gestiti a domicilio (che sono quelli in cui le condizioni generali non risultano particolarmente compromesse), l'approccio del medico curante consiste per lo più in una semplice valutazione clinica, con controllo dei principali parametri vitali, dello stato di idratazione e con il rilievo di riscontri obiettivi. Nella grande maggioranza dei casi l'addome è trattabile (pur se dolente alla palpazione) mentre, di contro, il riscontro di una obiettività addominale più rilevante ("difesa" alla palpazione, esacerbazione eccessiva del dolore) deve porre in guardia essendo significativo di un maggiore coinvolgimento dell'intestino.

Ad eccezione delle Regioni (Lombardia, Puglia) in cui sono previsti specifici Protocolli di sorveglianza per le GEE, abitualmente non si procede alla ricerca dell'agente eziologico responsabile delle GEE e questo rappresenta sicuramente una fonte di *bias* (=distorsione) nella valutazione del peso epidemiologico delle infezioni da STEC nelle GEE e in pediatria.

I casi che, in rapporto a manifestazioni più eclatanti o nelle regioni con Protocolli di sorveglianza, vengono ospedalizzati sono quelli in cui viene ricercata la presenza dello STEC nelle feci, con successiva tipizzazione sierologica. Tuttavia, anche in questi casi, non ci sono indagini di laboratorio che rappresentino "campanelli di allarme" verso la possibile l'evoluzione verso la SEU.

Normalmente le manifestazioni cliniche della gastroenterite proseguono per 5-7 gg, senza sostanziali variazioni di rilievo, attenuandosi gradualmente nell'85-90% dei casi con risoluzione completa della sintomatologia in 7-10 giorni. Nel restante 10-15% si assiste a progressivo peggioramento clinico, con evidenza agli esami ematochimici, di reperti che annunciano la comparsa della Sindrome Emolitico Uremica quali anemizzazione, piastrinopenia e alterazione degli indici di funzionalità renale. Ad eccezione di questa possibilità, la GEE è una malattia che tende ad autolimitarsi e, con il supporto richiesto e suggerito dalla Linee Guida della ESPGHAN/ESPID (38), a risolversi in breve tempo senza reliquati.

È verosimile che come per tutte le GE, anche nelle GEE agiscano, oltre all'agente eziologico, alcuni cofattori che, in qualche misura contribuiscono allo sviluppo di questa malattia. Tra questi è necessario sottolineare in maniera particolare la stagionalità, dal momento che il numero dei casi tende ad accentuarsi in maniera significativa nelle stagioni calde (fine primavera - estate) rispetto a quanto succede negli altri mesi. Al di là della responsabilità del fattore temperatura, è facile ipotizzare che a concorrere a questa "stagionalità" delle gastroenteriti da STEC agiscano altre concause quali il consumo di alimenti non correttamente conservati (proprio in virtù delle più elevate temperature ambientali) ed una maggiore esposizione ad ambienti potenzialmente contaminati (es. mare, nelle regioni costiere e corsi di acqua montani, nelle regioni alpine) per la possibile presenza nel primo caso di impianti fognari abusivi, non a norma, e di deiezioni di bovini al libero pascolo in montagna.

Sorveglianza clinica ed epidemiologica delle infezioni da STEC nella popolazione pediatrica

Attualmente, in Europa, per la maggior parte degli stati membri la notifica delle infezioni da STEC è obbligatoria ma ci sono Paesi che utilizzano sistemi volontari o sistemi alternativi. Nonostante i differenti sistemi presenti nei singoli paesi membri dell'UE, tutti i dati sui casi di infezione da STEC definiti uniformemente secondo criteri standard della UE, vengono inviati al sistema TESSy (The European Surveillance System), database unico europeo per la

raccolta dei dati di sorveglianza sulle malattie trasmissibili coordinato dallo European Center for Disease Prevention and Control (ECDC). La diversità di conferimento dei dati determina, tuttavia, lacune nella raccolta delle notifiche, nonché la perdita di una notevole quota di segnalazioni che emergono solo quando le gastroenteriti hanno generato complicanze. Per Francia, Italia e Spagna, in particolare, la sorveglianza dei casi di infezione da STEC nell'uomo si basa sulla segnalazione dei casi di SEU pediatrica (39).

**Definizione di caso di infezione da *Escherichia coli* produttore della Shigatossina / Verocitossina (STEC/VTEC), compresa la sindrome emolitica uremica (SEU)
Decisione di esecuzione (UE) 2018/945 della commissione del 22 giugno 2018.**

Criteri clinici

Diarrea da STEC/VTEC

Qualsiasi persona che presenti almeno una delle due seguenti manifestazioni:

- diarrea
- dolori addominali

Sindrome emolitica uremica (SEU)

Qualsiasi persona che presenti un blocco renale acuto e almeno una delle due seguenti manifestazioni:

- anemia emolitica microangiopatica
- trombocitopenia

Criteri di laboratorio

Almeno uno dei quattro seguenti criteri:

- isolamento/coltura di *Escherichia coli* che produce la tossina Shiga/verocitossina o contiene geni *stx1/vtx1* o *stx2/vtx2*
- isolamento di *Escherichia coli* O157 non fermentante il sorbitolo (senza test della tossina o dei geni che producono la tossina)
- identificazione diretta dell'acido nucleico dei geni *stx1/vtx1* o *stx2/vtx2*,
- identificazione diretta della tossina Shiga/verocitossina libera nelle feci

Solo per la SEU il seguente criterio può essere utilizzato come criterio di laboratorio per confermare la presenza di STEC/VTEC:

- risposta anticorpale sierogruppo specifica all' *Escherichia coli* (LPS).

Criteri epidemiologici

Almeno una delle cinque seguenti correlazioni epidemiologiche:

- trasmissione interumana,
- esposizione a una fonte comune,
- trasmissione da animale a uomo,
- esposizione ad alimenti o ad acqua da bere contaminati,
- esposizione ambientale.

Classificazione dei casi

A. Caso possibile di SEU associata a STEC

Qualsiasi persona che soddisfi i criteri clinici per la SEU.

B. Caso probabile di STEC/VTEC

Qualsiasi persona che soddisfi i criteri clinici, con una correlazione epidemiologica.

C. Caso confermato di STEC/VTEC

Qualsiasi persona che soddisfi i criteri clinici e di laboratorio.

In Italia, la sorveglianza delle infezioni da STEC avviene prevalentemente attraverso il Registro Italiano della Sindrome Emolitico Uremica attivo dal 2005 (40) in seno alla Società Italiana di Nefrologia Pediatrica (SINEPE). Originariamente basato su segnalazioni volontarie dei casi da parte dei principali centri di nefrologia pediatrica italiani¹, il Registro è attualmente coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità e ha l'obiettivo di raccogliere i dati epidemiologici, clinici e diagnostici dei pazienti pediatrici affetti da SEU tipica o atipica, approfondire le problematiche cliniche, assistenziali e di ricerca nel campo della SEU, promuovere la ricerca di base e la ricerca clinica sui temi inerenti la SEU, collaborare con altri registri e gruppi di studio, nazionali e internazionali, e promuovere la sorveglianza della SEU in Italia, collaborando alle attività di sanità pubblica veterinaria finalizzate alla prevenzione delle infezioni da STEC. I dati del Registro SEU sono pubblicati periodicamente sul sito Epicentro (<https://www.epicentro.iss.it/seu/registro-italiano-seu>). In Italia nel 2022 sono stati registrati 91 casi di SEU, con la quasi totalità dei pazienti appartenenti all'età pediatrica (40). Le Regioni in cui il tasso di segnalazione dei casi di SEU era superiore alla media nazionale erano Abruzzo, Campania, Emilia-Romagna, Liguria, Marche, Piemonte, Puglia e Toscana. I casi di SEU registrati nello scorso anno sono stati quasi il 40% in più rispetto alla media degli ultimi 10 anni, con un incremento più marcato nella stagione estiva. A questo aumento ha contribuito un cluster di casi di SEU associati a infezione da STEC O26 identificato in Emilia-Romagna tra giugno e luglio 2022. Poiché i casi registrati nel 2022 rappresentano il numero più elevato mai osservato in un singolo anno dall'avvio della sorveglianza, si impone un approfondimento dell'epidemiologia delle infezioni da STEC e l'applicazione di interventi di sanità pubblica volti ad interrompere le catene di

¹ AOU Regina Margherita, Torino; IRCCS Gaslini, Genova; Centro SEU, Clinica De Marchi, Milano; AO di Padova, Padova; IRCCS Burlo Garofalo, Trieste; AO Sant'Orsola Malpighi, Bologna; AO Salesi, Ancona; IRCCS Meyer, Firenze; IRCCS Bambino Gesù, Roma;; AO Santobono- Pausilipon, Napoli; AO S.Giovanni XXIII, Bari; AOU G.Marino, Messina AO G. Di Cristina, Palermo.

trasmissione ed evitare focolai epidemici.

Notifica

Nonostante l'Italia contribuisca alla raccolta dei dati sui casi di infezione da STEC segnalando solo i casi di SEU, attualmente i casi di malattia causati da STEC sono soggetti a notifica obbligatoria in classe II, come diarree infettive non da Salmonelle (DM 15/12/1990)(41). Secondo quanto previsto dal flusso di segnalazione, la notifica alla ASL da parte del medico o pediatra deve pervenire entro due giorni dall'osservazione del caso di malattia e il Dipartimento di Prevenzione deve, per ogni caso, effettuare l'indagine epidemiologica.

Con il decreto-legge 18 ottobre 2012, n. 179, convertito, con modificazioni, dalla legge 17 dicembre 2012, n. 221, viene creato il regolamento "Sistema di Segnalazione delle Malattie Infettive" PREMAL. Il Ministero della Salute con Decreto 7 marzo 2022, pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale Serie Generale n. 82 del 07/04/2022, ha effettuato una revisione del sistema al fine di migliorare i flussi informativi e l'efficacia complessiva della sorveglianza delle malattie infettive, comprese quelle causate da agenti di zoonosi (42). In particolare, l'elenco delle malattie infettive soggette a notifica tramite il PREMAL viene aggiornato regolarmente sulla base di evidenze scientifiche relative alle malattie emergenti e riemergenti. Tra queste, è stato introdotto nello specifico l'obbligo di notifica delle infezioni intestinali da Escherichia coli produttore della Shiga/Verocitossina (STEC/VTEC), includendo nell'ambito di queste infezioni anche i casi di SEU. In particolare, per le infezioni da STEC è previsto che il medico segnali all'Azienda sanitaria il caso sospetto entro 48 ore e che la competente struttura sanitaria dell'Azienda sanitaria alimenti il sistema PREMAL entro 7 giorni.

Il modello del protocollo di sorveglianza sindromica delle gastroenteriti emorragiche in età pediatrica: la Lombardia e la Puglia come esempio di best practice

Poco è noto sull'epidemiologia delle gastroenteriti emorragiche in età pediatrica. Tale manifestazione clinica può essere causata da un'ampia varietà di agenti patogeni, con incidenza variabile in funzione di area geografica,

stagione, età, condizioni socioeconomiche e stato immunitario. I dati più recenti indicano che i principali agenti patogeni sono *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium difficile* e STEC (43, 44). In presenza di gastroenterite emorragica in età pediatrica, un riconoscimento precoce delle infezioni da STEC si è dimostrato cruciale per un corretto management clinico-terapeutico dei casi che consenta di ridurre la probabilità di evoluzione in SEU.

In alcune regioni di Italia è attiva una sorveglianza sindromica delle gastroenteriti emorragiche (GEE) attraverso protocolli operativi che consentono di identificare precocemente quelle causate da STEC. I casi sono definiti come presenza di diarrea acuta con sangue visibile in almeno una evacuazione (identificato dal pediatra o riportato dai genitori/caregiver). I protocolli operativi si basano su uno screening di laboratorio centralizzato per la ricerca di STEC su campioni di feci/tampone rettale prelevati da tutti i bambini ospedalizzati con GEE. La diagnostica è basata sull'utilizzo di real-time PCR che consente, oltre alla diagnosi di STEC, l'identificazione dei geni di patogenicità *stx1*, *stx2*, *eae*, e del sierogruppo del patogeno. La centralizzazione delle attività di laboratorio garantisce una standardizzazione delle metodiche usate e la tempestività nella comunicazione dei risultati ai clinici. Il risultato di laboratorio, infatti, viene comunicato ai pediatri ospedalieri entro 12-24 ore dalla ricezione del campione. La diagnosi precoce consente una adeguata gestione dei casi dal punto di vista clinico-terapeutico e, inoltre, la caratterizzazione molecolare degli STEC consente di stimare la prevalenza nella popolazione dei diversi ceppi e geni di patogenicità e i sierogruppi più frequentemente associati ai casi di SEU. L'applicazione di questi protocolli risulta, dunque, cruciale per migliorare gli outcome della malattia e prevenire la comparsa di ulteriori complicanze e sequele permanenti e a lungo termine.

La Lombardia è stata la prima regione italiana ad introdurre nel 2010 un protocollo di sorveglianza sindromica delle GEE in bambini ospedalizzati basato sullo screening per lo STEC mediante multiplex real-time PCR (43). Tale protocollo è stato poi esteso anche al Piemonte e alla Valle d'Aosta. I

risultati di 10 anni di sorveglianza hanno mostrato che questo approccio ha consentito un abbattimento del tasso di letalità dal 5,2% allo 0,8%. Inoltre, la diagnostica precoce ha consentito di abbattere il numero di casi che hanno riportato sequele a lungo termine.

Anche in Puglia nel 2018 è stata attivata una sorveglianza sindromica delle GEE in età pediatrica (45). Il protocollo prevede che tutti i casi di GEE pediatrica osservati sul territorio da Pediatri di libera scelta, Pediatri del Servizio di Consulenza Ambulatoriale Pediatrica (SCAP), oltre a quelli identificati da Medici di Pronto Soccorso e Pediatri Ospedalieri, vengano ospedalizzati per consentire una adeguata gestione clinica e dell'accertamento di laboratorio (45). Nel protocollo pugliese, inoltre, per ogni caso di GEE pediatrica, è prevista sistematicamente la diagnosi differenziale mediante multiplex real-time PCR di *Campylobacter coli/jejuni*, *Salmonella* spp, *Shigella* spp/*E. coli* enteroinvasivo (EIEC), *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium difficile*. La ricerca di agenti virali come rotavirus, norovirus GI, norovirus GII, adenovirus enterici, sapovirus e astrovirus è stata implementata in relazione all'accertamento del ruolo che questi patogeni hanno come causa di GEE (46). Dal punto di vista clinico, la gestione dei casi prevede uno stretto monitoraggio mediante esami ematochimici, indici di funzionalità renale, elettroliti ed emogasanalisi, e la applicazione della iperidratazione precoce. Tutti i casi con infezione accertata da STEC vengono gestiti con uno stretto raccordo con il centro regionale di riferimento per le SEU (Ospedale Pediatrico Giovanni XXIII), che prende poi in carico tutti i casi con evoluzione in SEU. Le GEE da STEC vengono immediatamente comunicate dal laboratorio di riferimento che ha eseguito la diagnosi al Sistema di allerta rapido alimenti e mangimi Puglia (ALLERTA SARAM) del Servizio Sicurezza Alimentare e Sanità Veterinaria per gli adempimenti di competenza, compresa la comunicazione ai Dipartimenti di Prevenzione per l'avvio dell'indagine epidemiologica. Tale indagine viene poi ritrasmessa al nodo regionale al fine di pianificare le successive attività di monitoraggio e campionamento degli alimenti.

Il limite maggiore dei protocolli basati sulla sorveglianza sindromica delle GEE in età pediatrica è la impossibilità di intercettare precocemente i casi di SEU

che non esordiscono con GEE o quelli che evolvono molto rapidamente in SEU. In ogni caso, l'applicazione delle procedure di gestione delle GEE ha portato ad una riduzione della letalità della malattia e della comparsa di sequele a lungo termine (43, 47).

A seguito di queste esperienze regionali, è possibile ipotizzare che la esportazione di tali modelli di sorveglianza sindromica delle GEE in età pediatrica su scala nazionale possa consentire non solo un corretto management clinico delle infezioni da STEC, ma anche di raccogliere dati più sistematici sulla diffusione degli STEC nella popolazione pediatrica.

La possibilità di estendere i protocolli e le reti di monitoraggio per STEC delle GEE pediatriche anche altrove in Italia, risulta facilitata dalla disponibilità in tutte le regioni di almeno un centro di nefrologia pediatrica, con elevate esperienza e competenze nella gestione clinica dei pazienti con infezione da STEC e SEU, e di laboratori regionali di riferimento per le malattie trasmesse da alimenti (MTA). Tali strutture con il supporto del laboratorio nazionale di riferimento per *E.coli* presso l'ISS e del Registro Italiano SEU, possono rappresentare punti importanti per la costruzione di reti cliniche assistenziale e diagnostiche in ciascuna regione.

Bibliografia

1. Welch RA. The Genus *Escherichia*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E, curatori. *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass* [Internet]. New York, NY: Springer; 2006. p. 60–71. Disponibile su: https://doi.org/10.1007/0-387-30746-X_3
2. Ishii S, Sadowsky MJ. *Escherichia coli* in the Environment: Implications for Water Quality and Human Health. *Microbes Environ.* 2008;23(2):101–8.
3. Leclerc H, Mossel DA, Edberg SC, Struijk CB. Advances in the bacteriology of the coliform group: their suitability as markers of microbial water safety. *Annu Rev Microbiol.* 2001;55:201–34.

4. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* febbraio 2004;2(2):123–40.
5. Russo TA, Johnson JR. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect.* aprile 2003;5(5):449–56.
6. Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* marzo 2010;8(3):207–17.
7. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* gennaio 1998;11(1):142–201.
8. Watt S, Lanotte P, Mereghetti L, Moulin-Schouleur M, Picard B, Quentin R. *Escherichia coli* Strains from Pregnant Women and Neonates: Intraspecies Genetic Distribution and Prevalence of Virulence Factors. *J Clin Microbiol.* maggio 2003;41(5):1929–35.
9. Stefano Morabito. Pathogenic *Escherichia coli*: Molecular and Cellular Microbiology. Caister Academic Press; 2014.
10. Dobrindt U, Hochhut B, Hentschel U, Hacker J. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol.* maggio 2004;2(5):414–24.
11. Touchon M, Hoede C, Tenaillon O, Barbe V, Baeriswyl S, Bidet P, et al. Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genet.* gennaio 2009;5(1):e1000344.
12. Dobrindt U. (Patho-)Genomics of *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol IJMM.* ottobre 2005;295(6–7):357–71.
13. Russo TA, Johnson JR. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis.* maggio 2000;181(5):1753–4.
14. Smith JL, Fratamico PM, Gunther NW. Extraintestinal pathogenic

Escherichia coli. Foodborne Pathog Dis. 2007;4(2):134–63.

15. Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic Escherichia coli. Exp Mol Pathol. agosto 2008;85(1):11–9.
16. Bien J, Sokolova O, Bozko P. Role of Uropathogenic Escherichia coli Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney Damage. Int J Nephrol. 2012;2012:681473.
17. Bray J. Isolation of Antigenically Homogeneous Strains of Bact. coli neapolitanum from Summer Diarrhoea of Infants. J Pathol Bacteriol. 1945;57(2):239–47.
18. Donnenberg MS, Whittam TS. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli. J Clin Invest. 1 marzo 2001;107(5):539–48.
19. Baldini MM, Kaper JB, Levine MM, Candy DC, Moon HW. Plasmid-mediated adhesion in enteropathogenic Escherichia coli. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 1983;2(3):534–8.
20. Madhavan TPV, Sakellaris H. Colonization factors of enterotoxigenic Escherichia coli. Adv Appl Microbiol. 2015;90:155–97.
21. Nagy B, Fekete PZ. Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) in farm animals. Vet Res. 1999;30(2–3):259–84.
22. Nataro JP, Kaper JB, Robins-Browne R, Prado V, Vial P, Levine MM. Patterns of adherence of diarrheagenic Escherichia coli to HEp-2 cells. Pediatr Infect Dis J. settembre 1987;6(9):829–31.
23. Vial PA, Robins-Browne R, Lior H, Prado V, Kaper JB, Nataro JP, et al. Characterization of enteroadherent-aggregative Escherichia coli, a putative agent of diarrheal disease. J Infect Dis. luglio 1988;158(1):70–9.
24. Adachi JA, Ericsson CD, Jiang ZD, DuPont MW, Pallegar SR, DuPont HL. Natural history of enteroaggregative and enterotoxigenic Escherichia coli

infection among US travelers to Guadalajara, Mexico. *J Infect Dis.* 1 giugno 2002;185(11):1681–3.

25. Escher M, Scavia G, Morabito S, Tozzoli R, Maugliani A, Cantoni S, et al. A severe foodborne outbreak of diarrhoea linked to a canteen in Italy caused by enteroinvasive *Escherichia coli*, an uncommon agent. *Epidemiol Infect.* dicembre 2014;142(12):2559–66.
26. Mansan-Almeida R, Pereira AL, Giugliano LG. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains isolated from children and adults constitute two different populations. *BMC Microbiol.* 1 febbraio 2013;13:22.
27. Opintan JA, Bishar RA, Newman MJ, Okeke IN. Carriage of diarrhoeagenic *Escherichia coli* by older children and adults in Accra, Ghana. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* luglio 2010;104(7):504–6.
28. Scaletsky ICA, Fabbricotti SH, Carvalho RLB, Nunes CR, Maranhão HS, Morais MB, et al. Diffusely adherent *Escherichia coli* as a cause of acute diarrhea in young children in Northeast Brazil: a case-control study. *J Clin Microbiol.* febbraio 2002;40(2):645–8.
29. Karch H, Tarr PI, Bielaszewska M. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *Int J Med Microbiol IJMM.* ottobre 2005;295(6–7):405–18.
30. O'Brien AD, Lively TA, Chang TW, Gorbach SL. Purification of *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga)-like toxin from *Escherichia coli* O157:H7 strain associated with haemorrhagic colitis. *Lancet Lond Engl.* 3 settembre 1983;2(8349):573.
31. Guy Plunkett III, Rose DJ, Durfee TJ, Blattner FR. Sequence of Shiga Toxin 2 Phage 933W from *Escherichia coli* O157:H7: Shiga Toxin as a Phage Late-Gene Product. *J Bacteriol.* marzo 1999;181(6):1767.
32. Hunt JM. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). *Clin Lab Med.* marzo 2010;30(1):21–45.

33. Caprioli A, Morabito S, Brugère H, Oswald E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet Res.* 2005;36(3):289–311.
34. Karmali MA. Infection by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *Mol Biotechnol.* febbraio 2004;26(2):117–22.
35. Gasser C, Gautier E, Steck A, Siebenmann RE, Oechslin R. [Hemolytic-uremic syndrome: bilateral necrosis of the renal cortex in acute acquired hemolytic anemia]. *Schweiz Med Wochenschr.* 20 settembre 1955;85(38–39):905–9.
36. Karmali MA, Steele BT, Petric M, Lim C. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet Lond Engl.* 19 marzo 1983;1(8325):619–20.
37. Rivas M, Chinen I, Miliwebsky E, Masana M. Risk Factors for Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*-Associated Human Diseases. *Microbiol Spectr.* ottobre 2014;2(5).
38. Guarino A, Ashkenazi S, Gendrel D, Lo Vecchio A, Shamir R, Szajewska H, et al. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition/European Society for Pediatric Infectious Diseases evidence-based guidelines for the management of acute gastroenteritis in children in Europe: update 2014. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* luglio 2014;59(1):132–52.
39. ECDC. STEC infection Annual Epidemiological Report 2020. 2020; Disponibile su: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/STEC-infection-AER-2020-JD-FINAL.pdf>
40. EpiCentro. Dati del Registro Italiano Sindrome Emolitico Uremica (ISSEU) [Internet]. Disponibile su: <https://www.epicentro.iss.it/seu/epidemiologia->

italia

41. Decreto Ministeriale 15 dicembre 1990 Sistema informativo delle malattie infettive e diffusive. Pubblicato nella Gazz. Uff. 8 gennaio 1991, n. 6.
42. MINISTERO DELLA SALUTE. DECRETO 7 marzo 2022. Revisione del sistema di segnalazione delle malattie infettive (PREMAL). [Internet]. Disponibile su:
<https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2022/04/07/22A02179/sg>
43. Ardissino G, Vignati C, Masia C, Capone V, Colombo R, Tel F, et al. Bloody Diarrhea and Shiga Toxin-Producing Escherichia coli Hemolytic Uremic Syndrome in Children: Data from the Italkid-HUS Network. J Pediatr. ottobre 2021;237:34-40.e1.
44. Loconsole D, Giordano M, Laforgia N, Torres D, Santangelo L, Carbone V, et al. Case-management protocol for bloody diarrhea as a model to reduce the clinical impact of Shiga toxin-producing Escherichia coli infections. Experience from Southern Italy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol. marzo 2020;39(3):539–47.
45. Protocollo operativo Gastroenteriti Emorragiche in età pediatrica in Puglia (Prot. A00-005-000221 del 1 giugno 2018)
https://www.sanita.puglia.it/documents/20182/26606314/Protocollo+Operativo_Sorveglianza+Gastroenteriti+emorragiche+in+et%C3%A0+pediatrica.pdf/dc372a68-bcf3-465e-bf25-cee20a892da8.
46. Osservatorio Epidemiologico della Regione Puglia. Sorveglianza regionale delle gastroenteriti emorragiche in età pediatrica. Report sulle attività svolte dal 21/06/2018 al 30/11/2022.
<https://www.sanita.puglia.it/documents/20182/26606314/Report+GEE+2022.pdf/bca2ee52-df90-465a-8416-870e0ad0eae8>.
47. Loconsole D, Giordano M, Centrone F, Accogli M, Casulli D, De Robertis AL, et al. Epidemiology of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli Infections in

Southern Italy after Implementation of Symptom-Based Surveillance of Bloody Diarrhea in the Pediatric Population. Int J Environ Res Public Health. 16 luglio 2020;17(14):5137.