GHIACCIO E QUALITÀ DELL'ACQUA: UN DIBATTITO APERTO

Giuseppina Caggiano (a), Umberto Moscato (b), Maria Teresa Montagna (a)
(a) Dipartimento di Scienze Biomediche e Oncologia Umana - Sezione Igiene, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro", Bari
(b) Dipartimento Scienze della salute della donna, del bambino e di sanità pubblica- Sezione Igiene e Medicina del Lavoro, Fondazione Policlinico Agostino Gemelli IRCCS, Roma

Il ghiaccio rappresenta la fase solida dell'acqua ottenuto a pressione atmosferica standard (101 325 Pa) e temperatura $\leq$ 0°C. Il "ghiaccio alimentare" è definito come ghiaccio preparato con acqua potabile, portata a temperature pari o inferiori a 0°C, e che alla fusione si trasforma in acqua avente gli stessi requisiti previsti nel DL.vo del 2 febbraio 2001, n. 31 (1-2).

Il ghiaccio, utilizzato come refrigerante o come ingrediente è da considerarsi a tutti gli effetti un alimento, sostanza o prodotto trasformato, parzialmente trasformato o non trasformato, destinato ad essere ingerito. Deve, pertanto, rispondere ai requisiti della legislazione alimentare contenuti nel Regolamento (CE) 852/2004, che promuove l'osservanza delle disposizioni attraverso l'applicazione del Sistema HACCP (*Hazard Analysis Critical Control Point*) (3).

Nel corso degli ultimi anni, l'impiego del ghiaccio in campo alimentare è progressivamente aumentato in tutto il mondo. Fra i Paesi Europei, la Spagna ha il più elevato consumo di ghiaccio con oltre 400.000 tonnellate/anno di cui il 50% è autoprodotto, l'altro 50% è prodotto e confezionato in stabilimenti di produzione. In Italia si stima un consumo/anno pari a 58.000 tonnellate nei bar diurni e 25.000 tonnellate nei ristoranti, di cui il 60% consumato tra giugno e settembre. Si prevede che nei prossimi anni il consumo superi complessivamente 500.000 tonnellate/anno (4).

A fronte dei numerosi benefici conferiti dall'uso di ghiaccio alimentare, dati di letteratura nazionale e internazionale dimostrano come esso possa risultare inquinato, oltre che da diversi microrganismi di natura batterica e micotica, da varie sostanze chimiche e fisiche (5-6):

- Sostanze inorganiche tossiche (come ioni di metalli pesanti tipo arsenico, cromo, mercurio, cadmio, piombo, rame, alluminio, nichel, ecc..) generati essenzialmente dai reflui industriali o dall'uso indiscriminato di fitorfarmaci che, penetrando attraverso il suolo, possono inquinare sia acque superficiali che, ormai, profonde.
- Sostanze inorganiche nocive, tra cui fosfati e composti azotati prodotti dall'industria dei fertilizzanti e utilizzati in ambito agricolo e nelle coltivazioni.
- Composti organici tossici, compresi gli idrocarburi policiclici aromatici, i derivati benzenici, i solventi organici, i disinfestanti e insetticidi di derivazione industriale e impiego agricolo e civile.
- Tensioattivi, come il sodio lauril solfato e il benzalconio cloruro, utilizzati come solventi di processi industriali, nella detersione civile e nelle vernici.

Per quanto riguarda la contaminazione microbica, dal ghiaccio alimentare, in Italia, sono stati isolati batteri appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, Enterococchi e miceti, in particolare funghi filamentosi (7-9); in Grecia, è stata rilevata la presenza di Coliformi totali e fecali, spore di *Clostridium perfringens, Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia* spp. e *Salmonella* spp. (10-11); in Malaysia, il ghiaccio è risultato contaminato da Coliformi fecali (12); in Australia un'epidemia da *Salmonella saintpaul* è stata associata al ghiaccio presente nelle bevande servite durante una festa (13); in Vietnam, sono stati isolati *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*,

ceppi multiresistenti agli antibiotici come *E. coli* ESLB (*Extended-Spectrum-Beta-Lactamase*) (14). Inoltre sono stati documentati casi di colera sostenuti da *Vibrio cholerae O1 Ogawa ctxA* correlati al ghiaccio utilizzato nel tè (15) e un'epidemia da *Norwalk-like* virus in Puerto Rico verificatasi tra il 1986 e il 1988 con circa 5.000 casi, dovuta al consumo di ghiaccio prodotto da acqua contaminata a causa di sistemi di filtrazione e clorazione insufficienti (16).

Le cause della contaminazione del ghiaccio possono essere molteplici (Figura 1):

- assente o insufficiente trattamento dell'acqua destinata alla produzione di ghiaccio;
- produzione del ghiaccio in celle frigorifere non adeguatamente ventilate/filtrate e sanificate;
- manipolazione ghiaccio in modo inadeguato;
- insufficiente attenzione al sistema haccp nei processi di produzione;
- inadeguato trasporto e conservazione del ghiaccio in contenitori non sigillati.

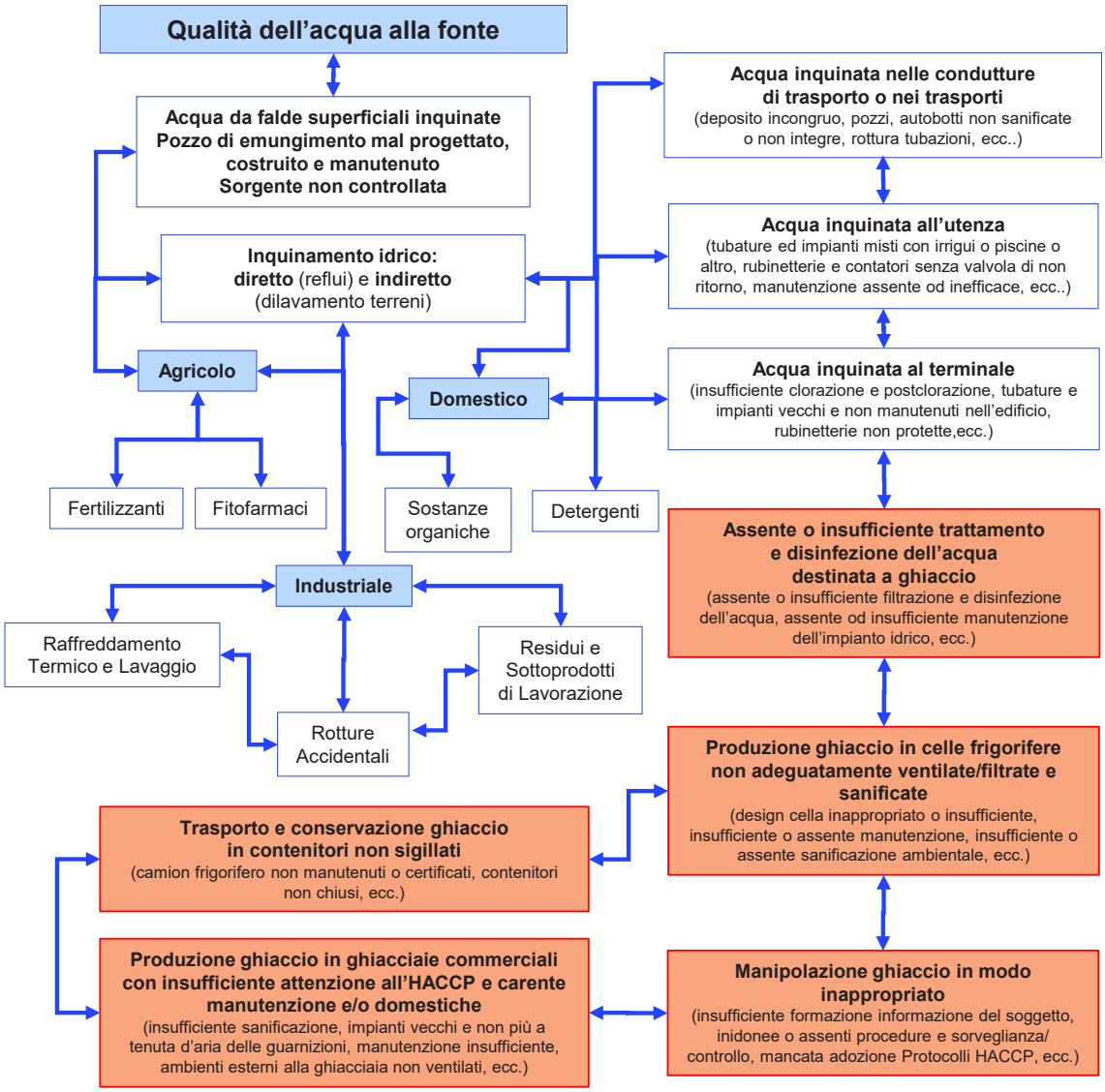

Figura 1. Schema logico riferito alle possibili cause di contaminazione del ghiaccio alimentare

La scarsa o insufficiente qualità dell'acqua e degli impianti utilizzati, piani e ambienti di lavoro non idoneamente sanificati, macchine del ghiaccio non sufficientemente igienizzate, scarsa manutenzione dei sistemi di impianto, insufficiente attenzione ai principi dell'HACCP o al manuale di buona prassi igienica per la produzione, trattamento, conservazione e utilizzo del ghiaccio, rappresentano altrettante fonti di rischio e pericolo per la salute umana e animale, soprattutto se si considera il recente concetto *One Health* che riconosce come la salute degli esseri umani sia legata alla salute degli animali e dell'ambiente (17-20).

Se il ghiaccio prodotto a livello della singola utenza domestica o pubblica può rappresentare un problema, potendo essere all'origine anche di epidemie da *Mycobacterium fortuitum* correlate alle macchine di produzione (21), certamente da non sottovalutare sono quelle situazioni di rischio di più ampia portata per la salute pubblica come le industrie alimentari, per il trattamento e la conservazione di alimenti surgelati, l'industria di allevamento ittico e animale (es. lavorazione del pollame per presenza di *Escherichia coli* ed *Enterobacteriaceae* persino in ghiaccio lavato) (22), gli stabilimenti ortofrutticoli (23-25). Infatti, da oltre dieci anni, in occasione della giornata mondiale della Salute, l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha indicato il ghiaccio come uno degli alimenti a più alto rischio di contaminazione biologica. Nel 2015, al fine di controllare il problema della contaminazione del ghiaccio, è stato redatto dall' Istituto Nazionale Ghiaccio Alimentare un "*Manuale di corretta prassi operativa per la produzione di ghiaccio alimentare*", approvato e inserito dal Ministero della Salute tra i Manuali di corretta prassi igienica, dove si sottolineano le caratteristiche igienico-sanitarie da rispettare nella produzione e gestione del ghiaccio ad uso alimentare (2).

È bene evidenziare come il ghiaccio contaminato possa rappresentare un rischio anche nell'ambito di attività assistenziali sanitarie, sia in modo indiretto (come potenziale sorgente di diffusione di batteri e lieviti del genere *Candida*) (26-27), sia in modo diretto, per l'utilizzo di ghiaccio privo di idoneo controllo in pratiche diagnostiche e/o trattamenti palliativi. A tal proposito, si ricorda un'epidemia da da *Enterobacter cloacae* a livello della ferita chirurgica durante la cardioplegia cardiaca e si evidenzia come il ghiaccio rientri nelle attuali raccomandazioni per alleviare il dolore derivante da mucositi e candidiasi del cavo orale nei pazienti in trattamento chemioterapico (28-30).

Scopo del nostro studio è verificare la qualità igienico-sanitaria del ghiaccio ad uso alimentare proveniente dalle attività di ristorazione pubblica e collettiva di alcuni Comuni della Regione Puglia, valutandone la conformità rispetto al DL.vo del 2 febbraio 2001, n. 31.

Materiali e metodi

Complessivamente sono stati analizzati 99 campioni di ghiaccio alimentare, prelevati direttamente dal vano di accumulo di macchine del ghiaccio localizzate presso attività di ristorazione pubblica e collettiva. Ciascun campione, pari ad 1 kg di ghiaccio in cubetti, era riposto in buste sterili per alimenti e trasportato in apposito frigo isotermico alla temperatura controllata di 4°C.

I campioni di ghiaccio, dopo fusione a temperatura ambiente, venivano sottoposti alla valutazione dei parametri obbligatori (Coliformi totali, *Escherichia coli* ed Enterococchi) e di alcuni parametri accessori (*Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa* e Miceti), impiegando il sistema delle membrane filtranti (membrane di cellulosa di 47 mm con pori da 0.45 μm - Millipore, Milano, Italy).

Per la ricerca di *E. coli* e dei batteri coliformi, 100 mL di ghiaccio fuso venivano filtrati e la membrana posta su piastre contenenti *Chomogenic Coliform Agar* (Biolife Italiana srl, Milano,

Italia (31). Dopo incubazione a 36 ± 2°C for 24 ± 2 h, le colonie blu-viola erano identificate come *E.coli*, quelle rosa salmone ossidasi negative come coliformi.

Per la ricerca di Enterococchi un'aliquota da 100 mL di ghiaccio fuso veniva filtrato, la membrana posta su terreno agar di Slanetz e Bartley (Biolife Italiana srl, Milano, Italia) e incubato a 36 ± 1°C per 48 h. Quando si sviluppavano colonie di colore rosa-rosso scuro, la membrana veniva trasferita su piastra contenente terreno Bile Esculin Azide agar e incubata a 44°C per 2 h. Le colonie marrone con alone bruno–nero e catalisi positive erano identificate come enterococchi (32).

Per la ricerca di *Pseudomonas aeruginosa,* dopo filtrazione di 250 mL di ghiaccio fuso, la membrana era posta su piastra contenente Pseudosel Agar (Becton Dickinson GmbH - Germany) e incubata a 36°C ± 2°C per 48 h; le colonie verdi confermate come colonie di *P. aeruginosa*.

Per la ricerca di *Staphylococcus aureus,* dopo filtrazione di un'aliquota di 250 mL di ghiaccio fuso, la membrana era posta su piastra di terreno selettivo e differenziale Mannital Salt Agar (Biolife Italiana srl, Milano, Italia). Dopo 24 h di incubazione, le colonie gialle con alone giallo che risultavano catalasi e coagulasi positivi erano identificate come *S.aureus.*

Per la ricerca dei miceti, sulla base del DL.vo del 2 febbraio 2002, n.27, quale integrazione al DL.vo del 2 febbraio 2001, n. 31, 100 mL di ghiaccio fuso venivano filtrati e la membrana posta su terreno selettivo Sabouraud dextrose agar con aggiunta di cloramfenicolo (0.5 g/L). Dopo 8 giorni di incubazione, i lieviti erano identificati tramite sistemi semiautomizzati di assimilazione degli zuccheri (gallerie API ID 32 BioMérieux), mentre i funghi filamentosi erano identificati tramite valutazione delle caratteristiche morfologiche macroscopiche e microscopiche secondo i metodi descritti da de Hoog (33).

Risultati

Il 45,4% dei campioni di ghiaccio alimentare è risultato non conforme secondo il DL.vo del 2 febbraio 2001, n. 31 per i parametri obbligatori: Coliformi (82,2%), Enterococchi (40%), *E. coli* (24,4%); tra i parametri aggiuntivi, è stata rilevata la presenza di miceti (95,5%), *P. aeruginosa* (40%), *S. aureus* (8%).

Il rimanente 55,5% dei campioni è risultato conforme per i parametri obbligatori, mentre riguardo i parametri aggiuntivi il 96,2% è risultato positivo per miceti, il 14,5% per *P. aeruginosa* e il 10,9% per *S. aureus*.

Conclusione

I nostri risultati, sebbene preliminari, hanno evidenziato importanti criticità igienico-sanitarie nella distribuzione del ghiaccio ad uso alimentare. A fronte delle evidenze riscontrate e delle auspicabili azioni programmate di controllo, che dovrebbero essere adottate dalle Autorità Competenti, appare opportuno suggerire la necessità di un'approfondita valutazione e applicazione di protocolli e regolamenti per garantire una corretta manutenzione e sanificazione degli impianti di produzione del ghiaccio, oltre che una puntuale informazione e formazione del personale che tratta, produce, conserva e manipola il ghiaccio alimentare.

Bibliografia

1. Italia. Decreto Legislativo 2 febbraio 2001, n. 31. Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano. *Gazzetta Ufficiale* n. 52, 3 marzo 2001 - Supplemento Ordinario n. 41.
2. Istituto Nazionale Ghiaccio Alimentare. *Manuale di corretta prassi operativa per la produzione di ghiaccio alimentare*. Roma: INGA; 2015. Disponibile all'indirizzo: http://www.quadernidellasalute.it/imgs/C_17_pagineAree_1187_listaFile_itemName_0_file.pdf; ultima consultazione 01/10/2020.
3. FAO, WHO. Codex Alimentarius. Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) system and guidelines for its application – Annex to CAC/RCP 1-1969 (Rev. 4-2003). Roma: FAO e WHO; 1997. Disponibile all'indirizzo: http://www.fao.org/3/Y1579E/y1579e03.htm#bm3; ultima consultazione 01/10/2020.
4. INGA, Istituto Nazionale del Ghiaccio Alimentare, ha presentato a Palermo il primo manuale per il "Ghiaccio Sicuro" approvato dal Ministero della salute. *LeNews.info* 04/2006. Disponibile all'indirizzo: https://www.lenews.info/inga-istituto-nazionale-del-ghiaccio-alimentare-presentato-palermo-primo-manuale-ghiaccio-sicuro/; ultima consultazione 17/07/2019.
5. Ministero della Salute. *Note informative e raccomandazioni del "Portale Acque"*. Roma: Ministero della Salute; 2014. Disponibile all'indirizzo: http://www.portaleacque.salute.gov.it/PortaleAcquePubblico/noteInformative.do/; ultima consultazione 18/08/2019.
6. Teixeira P, Brandão J, Silva S, Novak Babi M, Gunde-Cimerman N, Pires J, Costa S, Valério E. Microbiological and chemical quality of ice used to preserve fish in Lisbon marketplaces. *J Food Safety* 2019; e12641.
7. Gaglio R, Francesca N, Di Gerlando R, Mahony J, De Martino S, Stucchi C, Moschetti G, Settanni L. Enteric bacteria of food ice and their survival in alcoholic beverages and soft drinks. *Food Microbiol* 2017;67:17-22.
8. Francesca N, Gaglio R, Stucchi C, De Martino S, Moschetti G, Settanni L. Yeasts and moulds contaminants of food ice cubes and their survival in different drinks. *J Appl Microbiol* 2018;124(1):188-96.
9. Settanni L, Gaglio R, Stucchi C, De Martino S, Francesca N, Moschetti G. Presence of pathogenic bacteria in ice cubes and evaluation of their survival in different systems. *Ann Microbiol* 2017;67:827–35.
10. Gerokomou V, Voidarou C, Vatopoulos A, Velonakis E, Rozos G, Alexopoulos A, Plessas S, Stavropoulou E, Bezirtzoglou E, Demertzis PG, Akrida-Demertzi K. Physical, chemical and microbiological quality of ice used to cool drinks and foods in Greece and its public health implications. *Anaerobe* 2011;17(6):351-3.
11. Mellou K, Katsioulis A, Potamiti-Komi M, Pournaras S, Kyritsi M, Katsiaflaka A, Kallimania, Kokkinos P, Petinaki E, Sideroglou T, Georgakopoulou T, Vantarakis A and Hadjichristodoulou C. A large waterborne gastroenteritis outbreak in central Greece, March 2012: challenges for the investigation and management. *Epidemiol Infect* 2014;142(1):40–50.
12. Noor Izani NJ, Zulaikha AR, Mohamad Noor MR, Amri MA, Mahat NA. Contamination of faecal coliforms in ice cubes sampled from food outlets in Kubang Kerian, Kelantan. *Trop Biomed* 2012;29(1):71-6.
13. Draper AD, Morton CN, Heath JN, Lim JA, Markey PG. An outbreak of Salmonella Saintpaul gastroenteritis after attending a school camp in the Northern Territory, Australia. *Commun Dis Intell Q Rep* 2017;41(1):E10-E15.

14. Nakayama T, Ha NC, Quoc Le P, Kawahara R, Kumeda Y, Sumimura Y, Yamamoto Y. Consumption of edible ice contaminated with Acinetobacter, Pseudomonas, and Stenotrophomonas is a risk factor for fecal colonization with extended-spectrum β-lactamase-producing Escherichia coli in Vietnam. *J Water Health* 2017;15(5):813-22.

15. Nguyen TV, Pham QD, Do QK, Diep TT, Phan HC, Ho TV. Cholera returns to southern Vietnam in an outbreak associated with consuming unsafe water through iced tea: A matched case-control study. *PLoS Negl Trop Dis* 2017;11(4): e0005490.

16. Levine WC, Stephenson WT, Craun GF. Waterborne Disease Outbreaks, 1986-1988. *J Food Prot* 1991;54(1):71-8.

17. Lateef A, Oloke JK, Gueguim Kana EB and Pacheco E. The Microbiological Quality of Ice Used to Cool Drinks and Foods in Ogbomoso Metropolis, Southwest, Nigeria. *Internet Journal of Food Safety* 2006;8:39-43.

18. Destoumieux-Garzón D, Mavingui P, Boetsch G, Boissier J, Darriet F, Duboz P, Fritsch C, Giraudoux P, Le Roux F, Morand S, Paillard C, Pontier D, Sueur C, Voituron Y. The One Health Concept: 10 Years Old and a Long Road Ahead. *Front Vet Sci* 2018; 5:14.

19. Jalava K, Kauppinen A, Al-Hello H, Räsänen S. An outbreak of norovirus infection caused by ice cubes and a leaking air ventilation valve. *Epidemiol Infect* 2018;3:1-6

20. de Lima M, Melo MC, Monteiro AR. Evaluation of the processing of Perna perna mussels: the influence of water quality involved in the cooling operations in the physico-chemical and microbiological characteristics of the product. *J Sci Food Agric* 2013;93(13):3322-9.

21. Labombardi VJ, O'brien AM, Kislak JW. Pseudo-outbreak of Mycobacterium fortuitum due to contaminated ice machines. *Am J Infect Control* 2002;30(3):184-6.

22. Northcutt JK, Smith D. Microbiological and chemical analyses of ice collected from a commercial poultry processing establishment. *Poult Sci* 2010;89(1):145-9.

23. Reij MW, Den Aantrekker ED; ILSI Europe Risk Analysis in Microbiology Task Force. Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *Int J Food Microbiol* 2004;91(1):1-11.

24. Hampikyan H, Bingol EB, Cetin O, Colak H. Microbiological quality of ice and ice machines used in food establishments. *J Water Health* 2017;15(3):410-7.

25. Broekaert K, Heyndrickx M, Herman L, Devlieghere F, Vlaemynck G. Seafood quality analysis: Molecular identification of dominant microbiota after ice storage on several general growth media. *Food Microbiol* 2011;28(6):1162-9.

26. Kanwar A, Cadnum JL, Xu D, Jencson AL, Donskey CJ. Hiding in Plain Sight: Contaminated Ice Machines Are a Potential Source for Dissemination of Gram-Negative Bacteria and Candida Species in Healthcare Facilities. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2018;39(3):253-8.

27. Yorioka K, Oie S, Hayashi K, Kimoto H, Furukawa H. Microbial Contamination of Ice Machines Is Mediated by Activated Charcoal Filtration Systems in a City Hospital. *J Environ Health* 2016;78(10):32-5.

28. Breathnach AS, Riley PA, Shad S, Jownally SM, Law R, Chin PC, Kaufmann ME, Smith EJ. An outbreak of wound infection in cardiac surgery patients caused by Enterobacter cloacae arising from cardioplegia ice. *J Hosp Infect* 2006;64(2):124-8.

29. Worthington HV, Clarkson JE. Prevention of oral mucositis and oral candidiasis for patients with cancer treated with chemotherapy: cochrane systematic review. *J Dent Educ* 2002;66(8):903-11.

30. Worthington HV, Clarkson JE, Eden OB. Interventions for preventing oral mucositis for patients with cancer receiving treatment. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;(4):CD000978.

31. UNI EN ISO 9308-1. *Qualità dell'acqua - Conta di Escherichia coli e batteri coliformi - Parte 1: Metodo per filtrazione su membrana.* Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2017.

32. UNI EN ISO 7899-2: *Qualità dell'acqua - Ricerca ed enumerazione di enterococchi intestinali - Metodo di filtrazione su membrana*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2003.

33. De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Atlas of Clinical Fungi. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS); 2009.