

Challenge test (Regressione Lineare)

Scopo del saggio: Il metodo consente lo screening sulla efficacia del sistema conservante per confronto di nuove formulazioni di preparati cosmetici mediante l'inoculazione di microrganismi nel prodotto ed il controllo della sopravvivenza di questi nel tempo. La peculiarità di questo tipo di test sta negli intervalli di tempo ravvicinati con cui si va a verificare l'abbattimento della contaminazione indotta e la conseguente determinazione di una retta di regressione lineare. Il test può essere completato in 7 – 14 giorni.

I microrganismi normalmente studiati sono *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*. Tuttavia è possibile utilizzare microrganismi diversi, anche di ceppi selvaggi, in base alle esigenze del cliente e alla matrice del campione..

Il metodo si può applicare ai cosmetici ed alle preparazioni farmaceutiche in generale, ma necessita sempre di una seconda fase di challenge test vera e propria una volta individuata la formulazione migliore. Infatti la "regressione lineare"

Procedura: Il test consiste nell'inoculo a titolo noto, di microrganismi nel prodotto e, attraverso il controllo della loro sopravvivenza nel tempo, nella determinazione dell'efficacia del sistema conservante dello stesso. Il campione viene posto in tante provette quanti sono i ceppi da testare. Dopo avere distribuito uniformemente il microrganismo inoculato, si preleva un'aliquota del prodotto che viene dispersa nel diluente appropriato disattivante; da questa si eseguono diluizioni successive. Da ogni diluizione si preleva 1 ml che, posto in capsula petri, viene mescolato con il terreno agarizzato. Si lascia gelificare il terreno e si incubano le capsule alle temperature indicate per ogni ceppo per 2-4 giorni.

La determinazione delle Unità formanti colonie per grammo (UFC/g) viene eseguita al momento dell'inoculo dell'organismo (Tempo zero). Le tempistiche previste sono 0-2-4-24-48 e 168 ore. Il prodotto inoculato viene conservato a temperatura ambiente per tutta la durata del test.

Espressione dei risultati: Viene determinato il D-value (Decimal reduction Times), riportando in grafico il logaritmo del conteggio totale di ogni microrganismo inoculato in funzione del tempo e calcolandolo attraverso una regressione lineare della curva di sopravvivenza ottenuta. Per definizione il D-value è il tempo impiegato per abbattere di 1 log la concentrazione di microrganismo inoculato.

Criteria di interpretazione:

❖ Batteri patogeni/ Bacteria pathogen :

D -value \leq 4 ore

❖ Miceti / Miceti:

D -value \leq 28 ore