

## CHALLENGE TEST – METODO INTERNO

Il metodo, accreditato Sinal e basato sui criteri della Farmacopea Europea, consente la determinazione dell'efficacia del sistema conservante di un prodotto cosmetico mediante l'inoculazione di microrganismi nel prodotto stesso ed il controllo della loro sopravvivenza. Si tratta di un test particolarmente severo, che sottopone il prodotto cosmetico a condizioni molto spinte; viene infatti inoculata nel prodotto una grande quantità di microrganismi, che difficilmente si può sviluppare nelle normali condizioni d'uso.

I microrganismi normalmente studiati sono *Aspergillus brasiliensis*, *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 protocollo del Challenge Test prevede l'inoculo, a titolo noto, di microrganismi nel prodotto. L'efficacia del sistema conservante viene poi valutata attraverso il controllo della sopravvivenza dei microrganismi stessi nel corso del tempo.

In particolare, il prodotto 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 nell'appropriato diluente neutralizzante; 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. Il prodotto inoculato viene conservato a temperatura ambiente per tutta la durata del test.

La determinazione delle Unità formanti colonie per grammo (UFC/g) viene eseguita al momento dell'inoculo dell'organismo (Tempo zero) e alle tempistiche previste dalla Farmacopea Europea riportate di seguito, con i relativi criteri di interpretazione:

Riduzione logaritmica				
Criteri	dopo 2 gg	dopo 7gg	dopo14 gg	dopo28 gg
Batteri (criterio A)	2	3	-	nessun aumento
Batteri (criterio B)	-	-	3	nessun aumento
Miceti (criterio A)	-	-	2	nessun aumento
Miceti (criterio B)	-	-	1	nessun aumento