

Augenoptik – Kontaktlinsenpflegemittel –
Konservierungsmittelbelastungstest und Anleitung
zur Feststellung der Aufbrauchfrist
(ISO 14730:2000) Deutsche Fassung EN ISO 14730:2000

DIN
EN ISO 14730

ICS 11.040.70

Ophthalmic optics – Contact lens care products – Antimicrobial preservative efficacy testing and guidance on determining discard date (ISO 14730:2000);
German version EN ISO 14730:2000

Optique ophtalmique – Produits d'entretien des lentilles de contact – Essais de l'efficacité de conservation antimicrobienne et lignes directrices pour la détermination de la durée d'utilisation après première ouverture (ISO 14730:2000);
Version allemande EN ISO 14730:2000

Die Europäische Norm EN ISO 14730:2000 hat den Status einer Deutschen Norm.

Nationales Vorwort

Die Internationale Norm ISO 14730 wurde von ISO/TC 172/SC 7 unter Beteiligung deutscher Experten ausgearbeitet. Im DIN Deutsches Institut für Normung e.V. war hierfür der Normenausschuss Feinmechanik und Optik (NAFuO) zuständig.

Für die im Inhalt zitierten Internationalen Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

ISO/DIS 8320-2 siehe E DIN EN ISO 8320-2

ISO 14534 siehe DIN EN ISO 14534

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

E DIN EN ISO 8320-2, *Optik und optische Instrumente – Begriffe für Kontaktlinsen und Kontaktlinsenpflegemittel – Teil 2: Kontaktlinsenpflegemittel (ISO/DIS 8320-2:1999); Deutsche Fassung prEN ISO 8320-2:1999.*

DIN EN ISO 14534, *Augenoptik – Kontaktlinsen und Kontaktlinsenpflegemittel – Grundlegende Anforderungen (ISO 14534:1997); Deutsche Fassung EN ISO 14534:1997.*

Fortsetzung 22 Seiten EN

Normenausschuss Feinmechanik und Optik (NAFuO) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

– Leerseite –

Deutsche Fassung

**Augenoptik – Kontaktlinsenpflegemittel –
Konservierungsmittelbelastungstest und Anleitung
zur Feststellung der Aufbewahrungsfrist
(ISO 14730:2000)**

Ophthalmic optics – Contact lens care products –
Antimicrobial preservative efficacy testing and
guidance on determining discard date
(ISO 14730:2000)

Optique ophtalmique – Produits d'entretien des
lentilles de contact – Essais de l'efficacité de
conservation antimicrobienne et lignes
directrices pour la détermination de la durée
d'utilisation après première ouverture
(ISO 14730:2000)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 15. September 2000 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist.

Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim Management-Zentrum oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Luxemburg, Niederlande, Norwegen, Österreich, Portugal, Schweden, Schweiz, Spanien, der Tschechischen Republik und dem Vereinigten Königreich.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

Management-Zentrum: rue de Stassart, 36 B-1050 Brüssel

Vorwort

Der Text der Internationalen Norm ISO 14730:2000 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 172 „Optics and optical instruments“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 170 „Augenoptik“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch die Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis März 2001, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis März 2001 zurückgezogen werden.

Die Anhänge A bis F von EN ISO 14730 sind nur zur Information.

Entsprechend der CEN/CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen:

Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Luxemburg, Niederlande, Norwegen, Österreich, Portugal, Schweden, Schweiz, Spanien, die Tschechische Republik und das Vereinigte Königreich.

Anerkennungsnotiz

Der Text der Internationalen Norm ISO 14730:2000 wurde von CEN als Europäische Norm ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

ANMERKUNG Die normativen Verweisungen auf Internationale Normen sind im Anhang ZA (normativ) aufgeführt.

Einleitung

Kontaktlinsenpflegemittel werden zusammen mit Kontaktlinsen angewandt. Diese Produkte dienen dazu, Kontaktlinsen zu spülen, zu reinigen und zu desinfizieren, aufzubewahren, zu befeuchten, den Tragekomfort der Kontaktlinsen zu erhöhen und die Kontaktlinsen zu konditionieren. Dabei gibt es Produkte, die nur eine dieser Funktionen haben, während andere mehrere Funktionen gleichzeitig erfüllen.

Gewöhnlich können Produkte für Hydrogel-Kontaktlinsen auch für gaspermeable formstabile Kontaktlinsen oder für Polymethylmethacrylat-Linsen verwendet werden, jedoch sind speziell für gaspermeable formstabile Kontaktlinsen oder Polymethylmethacrylat-Linsen hergestellte Produkte üblicherweise nicht für Hydrogel-Kontaktlinsen geeignet.

Die meisten Kontaktlinsenpflegemittel werden als Lösungen hergestellt und in Mehrdosisbehältern abgefüllt und verkauft. Festprodukte werden in Form von Tabletten oder Granulat verkauft und müssen unmittelbar vor dem Gebrauch in einem geeigneten Lösungsmittel aufgelöst werden.

Falls das Kontaktlinsenpflegemittel (Lösung) selbst keine antimikrobielle Wirkung hat, kann ein antimikrobielles Konservierungsmittel zugesetzt werden, um die Vermehrung von Mikroorganismen zu verhindern, die durch wiederholten Gebrauch und anschließende Aufbewahrung in das Kontaktlinsenpflegemittel gelangen können. Alle antimikrobiellen Wirkstoffe haben für den Verbraucher ein toxisches Potential. Um dem Verbraucher größtmögliche Sicherheit zu bieten, sollte die Konservierungsmittelkonzentration so gewählt werden, dass ein angemessener Konservierungsgrad bei minimaler Toxizität erreicht wird.

Es bestehen Unterschiede zwischen ophthalmischen Zubereitungen und Kontaktlinsenpflegemitteln, wobei einige dieser Unterschiede im Hinblick auf Konservierungsmittelbelastungstests bedeutungsvoll sind. Üblicherweise werden ophthalmische Zubereitungen in kleinen Mengen abgepackt und sind zum kurzfristigen Gebrauch bei behandlungsbedürftigen Augen vorgesehen. Kontaktlinsenpflegemittel werden in größeren Packungen vertrieben und langfristig gemeinsam mit Kontaktlinsen an gesunden Augen eingesetzt. Das potentielle Risiko von Kontaktlinsenpflegemitteln besteht einerseits in der Wechselwirkung zwischen der Lösung und der Kontaktlinse, die zu Irritationen des Auges führen kann, und andererseits dem Risiko der Verunreinigung der Lösung durch den wiederholten (täglichen) Gebrauch.

Daher muss bei der Rezeptur von Kontaktlinsenpflegemitteln zwischen der Gefahr unerwünschter Reaktionen des Patienten aufgrund der Wechselwirkung von Kontaktlinse und/oder Lösung und den

durch die Aufrechterhaltung der antimikrobiellen Wirkung der Lösung gewonnenen Vorteilen für die Sicherheit abgewogen werden.

Die vorliegende Internationale Norm gibt das Testverfahren und die Leistungsmerkmale für die Wirkung der Konservierungsmittel vor. Das Verfahren ist von Arzneibüchern übernommen worden, die eine Zeitbegrenzung des Tests auf 28 Tage festgelegt haben. In den informativen Anhängen sind vier Beispiele von Testverfahren für Konservierungsmittel aufgeführt, die von den Herstellern von Kontaktlinsenpflegemitteln entwickelt wurden, um die Wirksamkeit von Konservierungsmitteln bei Produkten aufzuzeigen, deren Aufbrauchsfrist 28 Tage überschreitet.

1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm legt ein Verfahren fest, welches zur Bewertung der Konservierungsleistung aller konservierten Mehrdosis-Kontaktlinsenpflegemittel einzusetzen ist, und sie stellt in informativen Anhängen einen Leitfaden zu Verfahren zur Bestimmung der Aufbrauchsfrist zur Verfügung.

Der Test gilt für Produkte mit einer Aufbrauchsfrist von bis zu 28 Tagen.

Der Test gilt nicht für sterile Produkte, die in Einzeldosen zum einmaligen Gebrauch verpackt sind, oder Mehrdosisbehälter, die aufgrund ihrer Konstruktion über eine mechanische Barriere gegen mikrobielle Verunreinigungen verfügen.

ANMERKUNG 1 Grundprinzipien des Tests dürfen auch dazu angewendet werden, eine längere Aufbrauchsfrist als 28 Tage festzulegen. Siehe hierzu Anhänge B, C, D und E.

ANMERKUNG 2 Ein mehrfaches Animpfen, ein Animpfen mit einer mikrobiologischen Mischprobe, die Einbeziehung von Kontaktlinsen oder der Zusatz einer organischen Verunreinigung kann möglicherweise die antimikrobielle Wirkung eines bestimmten Produktes beeinflussen. Die Bewertung dieser Faktoren sowie die Prüfung eines erweiterten Spektrums von Mikroorganismen und das Testen von Proben aus angebrochenen Behältern können zwar bei der Entwicklung eines Kontaktlinsenpflegemittels wichtig sein, werden aber bei dieser Internationalen Norm nicht berücksichtigt.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden normativen Dokumente enthalten Festlegungen, die durch Verweisung in diesem Text Bestandteil der vorliegenden Internationalen Norm sind. Bei datierten Verweisungen gelten spätere Änderungen oder Überarbeitungen dieser Publikationen nicht. Anwender dieser Internationalen Norm werden jedoch gebeten, die Möglichkeit zu prüfen, die jeweils neuesten Ausgaben der nachfolgend angegebenen normativen Dokumente anzuwenden. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen normativen Dokuments. Mitglieder von ISO und IEC führen Verzeichnisse der gültigen Internationalen Normen.

ISO 8320-2:-¹⁾, *Contact lenses and contact lens care products – Vocabulary – Part 2: Contact lens care products*.

ISO 14534:1997, *Ophthalmic optics – Contact lenses and contact lens care products – Fundamental requirements*.

3 Begriffe

Für die Anwendung dieser Internationalen Norm gelten die Begriffe von ISO 8320-2.

4 Kurzbeschreibung

4.1 Bei dem Test wird die Zubereitung mit einem vorgegebenen Inokulum geeigneter Mikroorganismen zu Beginn des Tests und dann noch einmal an Tag 14 beimpft; die beimpften Zubereitungen werden bei einer vorgegebenen Temperatur gelagert; schließlich werden aus den beimpften Zubereitungen in bestimmten Zeitabständen Proben entnommen und zur Feststellung der Anzahl der lebensfähigen Organismen kultiviert. Wie wirksam das Produkt die Vermehrung der eingebrachten Organismen verhindert, wird durch Auszählen der lebensfähigen Organismen über längere Zeiträume festgestellt.

¹⁾ Noch zu veröffentlichen.

4.2 Die in dem Test gewählte Stärke der mikrobiellen Belastung soll nicht für die tatsächlich zu erwartende Belastung repräsentativ sein, sondern sie soll messbare Zahlen liefern, mit deren Hilfe entsprechende Abtötungsraten der Keime berechnet werden können.

4.3 Die konservierenden Eigenschaften des Produkts sind dann ausreichend, wenn unter den gegebenen Testbedingungen die Anzahl der Bakterien deutlich verringert wird und nach Ablauf der vorgeschriebenen Zeit bei der angegebenen Temperatur keine Zunahme der Anzahl der Schimmelpilze und Hefen in der beimpften Zubereitung auftritt. Die Leistungsmerkmale sind unter 5.6 aufgeführt.

4.4 Bei der Kultivierung und dem Auszählen der überlebenden Organismen sind geeignete Maßnahmen zur Inaktivierung oder Beseitigung verbliebener antimikrobieller Wirkstoffe zu ergreifen. Diese Inaktivierungsmaßnahmen müssen validiert werden.

5 Testmethoden

5.1 Materialien und Reagenzien

5.1.1 Testorganismen

Es müssen die in Tabelle 1 aufgeführten Bakterienstämme verwendet werden.

ANMERKUNG Testorganismen aus anderen Kulturbanken, die ebenfalls verwendet werden dürfen, sind in Anhang F aufgeführt.

Tabelle 1 – Testorganismen

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 16404

5.1.2 Kulturmedien und Reagenzien

5.1.2.1 Trypton Soya Agar (TSA)

5.1.2.2 Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

5.1.2.3 Dulbeccos phosphatgepufferte Kochsalzlösung ohne Calciumchlorid und Magnesiumchlorid (DPBS).

200 mg/l KCl, 200 mg/l KH_2PO_4 , 8 000 mg/l NaCl und 2 160 mg/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ oder geeignete Verdünnungslösung.

5.1.2.4 Dulbeccos phosphatgepufferte Kochsalzlösung plus 0,05 % G/V Polysorbat 80 (DPBST) oder geeignete Verdünnungslösung.

5.1.2.5 Validiertes Neutralisationsmedium, sofern erforderlich, z. B. Dey-Engley Neutralisationslösung (DEB) und Letheen Lösung.

5.1.3 Laborgeräte

Folgende gängige Laborausstattung ist erforderlich: sterile Pipetten, Tupfer, Röhrchen, Petrischalen (90 mm bis 100 mm × 20 mm) usw. Darüber hinaus werden Geräte benötigt, die zur spektrophotometrischen Bestimmung der Zelldichte, zum Zählen der Kolonien und zur Zentrifugation geeignet sind.

5.2 Probenmaterial und Kulturbedingungen

Das zu testende Produkt muss stellvertretend für das zu vermarktende Produkt stehen. Aliquots sollten erst unmittelbar vor dem Test direkt aus dem endgültigen Produktbehältnis entnommen werden.

Es müssen drei Produktchargen geprüft werden. Dabei ist jede Produktcharge gesondert mit den verschiedenen Prüforganismen zu testen.

Die Testkulturen sind entsprechend den Empfehlungen des Kurators der betreffenden Kulturbank zu pflegen.

Kulturen sollten nicht mehr als fünf Passagen von der Stammkultur entfernt sein (ATCC, NCIB, NCTC, NCPF oder anderen anerkannten Stammkulturen; siehe Anhang F). Jede Passage ist eine Subkultur der vorangehenden Passage.

5.3 Zubereitung der mikrobiellen Belastungskeime (Inokulum)

Jeder Testorganismus ist in Kulturröhrchen mit Schrägagar unter den in Tabelle 2 genannten Bedingungen zu kultivieren.

Tabelle 2 – Nährmedien und Inkubationsbedingungen für das Wachstum der Inokulationsorganismen

Organismus	Nährmedium	Temperatur °C	Inkubationszeit
<i>P. aeruginosa</i>	TSA	30 bis 35	18 h bis 24 h
<i>S. aureus</i>	TSA	30 bis 35	18 h bis 24 h
<i>E. coli</i>	TSA	30 bis 35	18 h bis 24 h
<i>C. albicans</i> oder <i>C. albicans</i>	SDA	20 bis 25	42 h bis 48 h
	SDA	30 bis 35	18 h bis 24 h
<i>A. niger</i>	SDA	20 bis 25	7 Tage bis 10 Tage

Zur Gewinnung der jeweiligen Kultur ist sterile DPBST oder eine andere geeignete Lösung zu verwenden; die oberflächlich wachsenden Keime sind abzuwaschen, in ein geeignetes Gefäß zu übertragen und mit einem Reagenzglas mischen. Die Sporensuspension ist durch sterile Glaswolle oder Gaze zu filtern, um Hyphenbruchstücke zu entfernen.

Nach der Gewinnung können die herangezogenen Organismen durch Zentrifugieren gewaschen werden. Die Bakteriensuspensionen können gefiltert werden (Porengröße z. B. 3 µm bis 5 µm), um eine Suspension von Einzelzellen zu erhalten. Danach sind alle Bakteriensuspensionen mit DPBST oder einem anderen geeigneten Lösungsmittel auf eine Konzentration von 1×10^7 KBE/ml bis 1×10^8 KBE/ml einzustellen. Durch spektrophotometrische Trübungsmessung der Suspension oder einer Verdünnung der Suspension ist die ungefähre Zellkonzentration jeder Suspension abzuschätzen. Die tatsächliche Konzentration an koloniebildenden Einheiten pro ml ist während des Tests für jede Suspension z. B. durch Auszählen der Platte zu ermitteln.

Wenn eine Zentrifugation eingesetzt wird, sollte diese bei 20 °C bis 25 °C durchgeführt werden und nicht länger als ein Äquivalent von 10 min bei $4\,000 \times g$ (oder weniger) andauern.

Zellsuspensionen mit Hefen und Bakterien sind am Tag der Zubereitung zu verwenden.

ANMERKUNG 1 Bei niedrigeren Umdrehungszahlen kann eine längere Zentrifugationszeit erforderlich sein.

ANMERKUNG 2 Sporensuspensionen können innerhalb von 7 Tagen nach der Zubereitung verwendet werden, wenn sie kühl (2 °C bis 8 °C) aufbewahrt werden.

5.4 Inokulationsmethode

5.4.1 Es sind je Testorganismus und Charge zu prüfender Lösung ein oder mehrere Röhrchen vorzubereiten, die mindestens 10 ml Testlösung enthalten.

ANMERKUNG Um eine effektive technische Durchführung des Tests zu ermöglichen, ist die Verwendung von Probenröhrchen der Verwendung von Kontaktlinsengefäßen vorzuziehen. Da zwischen den Inhaltsstoffen der Lösung und dem Material der Röhrchen jedoch Unverträglichkeiten möglich sind, sollte auf die Wahl von Röhrchen aus geeignetem Material geachtet werden.

Das Probenröhrchen mit dem zu testenden Produkt ist mit einer Lösung zu beimpfen, die eine Endkonzentration des Testorganismus von $1,0 \times 10^5$ KBE/ml bis zu $1,0 \times 10^6$ KBE/ml sicherstellt. Dabei ist darauf zu achten, dass das Volumen des Inokulums nicht 1 % des Gesamtvolumens der Probe überschreitet. Das Inokulum muss durch gründliches Mischen gleichmäßig verteilt werden.

5.4.2 Das beimpfte Produkt ist bei 20 °C bis 25 °C lagern. Die Temperatur ist mittels eines kalibrierten Geräts zu überprüfen und schriftlich festzuhalten.

Lichtempfindliche Produkte sollten während der Dauer des Tests entsprechend geschützt werden.

5.4.3 Am Tag 7 und 14 sind 1,0-ml-Aliquots des beimpften Produkts zum Zählen der lebensfähigen Keime zu entnehmen.

5.4.4 Nach Entnahme der Probe am Tag 14 ist jede Probe erneut, wie in 5.4.1 beschrieben, mit einem Inokulum von $1,0 \times 10^4$ KBE/ml bis $1,0 \times 10^5$ KBE/ml zu beimpfen.

5.4.5 Am Tag 21 und 28 sind 1,0-ml-Aliquots des wiederbeimpften Produkts zum Zählen der lebensfähigen Keime zu entnehmen.

5.4.6 Alle 1,0-ml-Aliquots, die zu den genannten Zeitpunkten entnommen wurden, sind einer angemessenen Reihe dezimaler Verdünnungsschritte in validierten Neutralisationsmedien zu unterwerfen. Die Suspension ist mit einem Reagenzglas mischer kräftig zu mischen und einige Zeit stehen zu lassen, um die Neutralisierung vollständig zu beenden. Die Neutralisationsbedingungen müssen durch Untersuchungen zur Wiederfindung belegt werden (siehe 5.5.2).

Wenn ein antimikrobieller Wirkstoff in der Rezeptur nicht ausreichend inaktiviert oder neutralisiert werden kann, so ist er durch ein validiertes Membranfiltrationsverfahren (siehe Anhang A) zu entfernen.

5.4.7 Die Anzahl lebensfähiger Keime der Organismen ist nach Anfertigung geeigneter Verdünnungen in einem angemessenen Wiederfindungsmedium (z. B. TSA für Bakterien und SDA für Schimmelpilze und Hefen) durch Auszählen von drei Platten (in begründeten Fällen auch anders) zu bestimmen.

Wenn eine Membranfiltration zur Beseitigung oder Neutralisation von antimikrobiellen Wirkstoffzusätzen durchgeführt wurde, sind die Membranen auf diesen Nährmedien in angemessener Weise zu kultivieren.

Beim Gussplattenverfahren ist der Agar vor dem Ausgießen in die Platten bei unter 50 °C zu halten.

ANMERKUNG Das zur Zählung der lebensfähigen Keime verwendete Agarnährmedium darf erforderlichenfalls auch Stoffe zur Inaktivierung oder Neutralisation von Konservierungsmitteln enthalten.

5.4.8 Die Platten zur Bakterienrückgewinnung sind bei 30 °C bis 35 °C zu inkubieren. Die Platten zur Heferückgewinnung sind bei 20 °C bis 25 °C oder 30 °C bis 35 °C zu inkubieren. Die Platten zur Rückgewinnung der Schimmelpilze sind bei 20 °C bis 25 °C zu inkubieren. Die Inkubationszeiten für eine optimale Rückgewinnung von Bakterien, Hefe und Pilzen müssen bestimmt werden. Die Mindestinkubationszeiten müssen auf der Basis von Kontrolluntersuchungen mit dem Wiederfindungsmedium festgelegt werden (siehe 5.5.2). Es ist die Anzahl der beobachteten KBE in den auswertbaren Platten zu dokumentieren.

Die Platten sollten während der Inkubation regelmäßig überprüft werden, um zu verhindern, dass die Platten durch Überwachsung nicht auswertbar sind.

5.4.9 Auf den auswertbaren Platten ist die durchschnittliche Anzahl koloniebildender Einheiten zu bestimmen. Anschließend ist die Reduktion der Anzahl an Mikroorganismen für die jeweiligen Zeitpunkte zu berechnen.

ANMERKUNG Platten sind auswertbar, wenn – mit Ausnahme von Primärverdünnungen von 10^0 oder 10^{-1} – bei Bakterien und Hefen 30 KBE bis 300 KBE je Platte und bei Pilzen 8 KBE bis 80 KBE je Platte vorliegen.

5.4.10 Wenn Platten für alle Verdünnungen einer Probe zu einem einzelnen Zeitpunkt keine Kolonien von Mikroorganismen aufweisen, ist dies zu dokumentieren, z. B. durch den Vermerk „0“ oder „NR“ (en: no recovery).

5.4.11 Die Konzentration überlebender Keime wird für jeden Zeitpunkt berechnet. Die Konzentration überlebender Keime nach Wiederbeimpfung am Tag 14 errechnet sich aus der Summe der Wiederbeimpfungskonzentration am Tag 14 und der Konzentration überlebender Keime vor der Wiederbeimpfung.

5.5 Kontrollen

5.5.1 Inokulationskontrollen

Die Konzentrationen der ersten und der zweiten Inokulation werden berechnet, indem ein gleich großes (gleich groß wie in 5.4.1) Aliquot des Inokulums im gleichen Volumen einer geeigneten Lösung aufgenommen wird. Dabei soll für die erste Inokulation eine Konzentration von mindestens $1,0 \times 10^5$ KBE/ml bis $1,0 \times 10^6$ KBE/ml und für die Wiederbeimpfung eine Konzentration von mindestens $1,0 \times 10^4$ KBE/ml bis $1,0 \times 10^5$ KBE/ml erzielt werden. Das Volumen des Inokulums darf dabei 1 % des Gesamtvolumens der Kontrolllösung nicht übersteigen. Durch kräftiges Mischen ist eine Verteilung des Inokulums sicherzustellen. Diese Kontrollen zur Bestimmung der KBE/ml müssen zu Beginn der eigentlichen Prüfung durchgeführt werden, um die Eignung des Nährmediums, das für die Kultur der Testorganismen benutzt wird, sicherzustellen und eine Schätzung der Konzentration der ersten Inokulation zu ermöglichen. Aus jedem Röhrchen ist ein entsprechendes Aliquot im Dreifachansatz (in begründeten Fällen auch anders) auf die Agarplatten zu geben.