

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 848**

51 Int. Cl.:

A61L 2/28 (2006.01)

A61L 12/06 (2006.01)

G01N 31/22 (2006.01)

G01J 1/50 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.06.2013** **E 13174362 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017** **EP 2679248**

54 Título: **Método para cuantificar dosis UV desinfectantes usando indicadores**

30 Prioridad:

29.06.2012 US 201261665960 P

24.06.2013 US 201313924693

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

24.11.2017

73 Titular/es:

JOHNSON & JOHNSON VISION CARE, INC.
(100.0%)

7500 Centurion Parkway, Suite 100
Jacksonville, FL 32256, US

72 Inventor/es:

PUGH, RANDALL B.;
KERNICK, EDWARD R.;
PUTT, KARSON S. y
O'BRIEN, TERRY

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 643 848 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para cuantificar dosis UV desinfectantes usando indicadores

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención está relacionada con el campo de la esterilización y, más específicamente, con la desinfección de una lente utilizando una o más dosis UV (ultravioletas) desinfectantes programadas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 US2001/0048891A1 está relacionado con un método y un equipo para verificar la esterilización ultravioleta.

Actualmente, la desinfección de una lente oftálmica incluye diversos componentes químicos líquidos que en algunos casos pueden reaccionar con acumulaciones de partículas y organismos microbianos para obtener una esterilización. Sin embargo, en muchos casos, usando estas soluciones químicas puede que no se obtenga dicha esterilización y, además, dichas soluciones pueden quedarse en la lente oftálmica e interactuar con el ojo del usuario. Esta interacción puede acarrear algunos efectos adversos, como, por ejemplo, provocar malestar o quemazón, afectar al equilibrio químico de la película lagrimal, etc.

20 Por lo tanto, resulta deseable que los nuevos métodos y sistemas o equipos de esterilización mejorados que se desarrollan puedan solventar estas limitaciones y efectos secundarios, dando respuesta a las necesidades de esterilización que están presentes desde hace tiempo en el campo de las lentes oftálmicas.

RESUMEN DE LA INVENCION

25 La presente invención está relacionada con un método para obtener una medición cuantitativa de dosis de radiación o irradiación ultravioleta (UV), tal y como se especifica en la reivindicación 1. Más específicamente, de manera que la dosis pueda medirse en el recipiente o contenedor utilizado para la aplicación o puesta en práctica de la esterilización ultravioleta.

30 En algunos aspectos de la presente invención, se describe el desarrollo de un método de medición basado en la degradación de diversos cromóforos/fluoróforos que puede usarse como método cuantitativo para determinar la dosis UV en un líquido o como indicador -químico, visual, cualitativo y que cambia de color- de la esterilización UV (o esterilización ultravioleta).

35 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS ILUSTRACIONES

Las ilustraciones adjuntas, que se incorporan a esta especificación y forman parte de la misma, ilustran las realizaciones de la presente invención y, junto con la descripción, sirven para explicar los objetivos, ventajas y principios de la invención.

40 La Figura 1 (Fig. 1) muestra curvas ejemplares de experimentos realizados de forma independiente, de manera que se representa: A) La pérdida de fluorescencia (ex./em. 490/520 nm) de diversas concentraciones de fluoresceína tras su irradiación con dosis conocidas de luz UV de 254 nm. B) Todas las curvas de degradación de la fluoresceína se desploman hasta alcanzar la misma curva cuando la fluorescencia bruta se convierte a un porcentaje del valor inicial de fluorescencia.

45 La Figura 2 muestra las estructuras químicas ejemplares de los cromóforos y los fluoróforos.

La Figura 3 muestra las curvas ejemplares que representan experimentos independientes, de manera que se representa: A) La pérdida de la intensidad de fluorescencia o absorbancia de 10 mg/mL de cromóforos y 3,5 mg/mL de fluoresceína tras una irradiación con dosis conocidas de luz UV de 254 nm en forma de porcentaje del valor inicial. La absorbancia o excitación y las longitudes de onda de las emisiones para cada colorante o tintura se muestran entre paréntesis. Cada curva representa tres experimentos independientes. B) El rango de cuantificación de las dosis UV para cada colorante.

50 La Figura 4 muestra los grupos de contenedores ejemplares con diversos plásticos distribuidos de forma desigual para bloquear parcialmente la luz UV. A) El porcentaje de transmisión de UV de los materiales de cada grupo de recipientes o contenedores. B, C, D) La inhibición de la transmisión de UV y la correspondiente pérdida de esterilización de *Escherichia coli* (B), *Staphylococcus aureus* (C) y *Candida albicans* (D). La irradiancia total de cada grupo (n=6) fue de 100 mW*s/cm² en el caso de las bacterias (B, C) y de 250 mW*s/cm² en el caso de *C. albicans* (D), de manera que se midió la potencia de salida de las bombillas UV. La dosis UV presente en el recipiente se calculó por medio de la degradación de Eritrosina B (barras blancas) y se determinó el número de organismos viables que quedaron tras la irradiación (barras negras). Todas las barras de error representan el error estándar.

55 La Figura 5(A) muestra los cambios visuales ejemplares de Eritrosina B y Carmín de índigo tras una exposición a luz UV de 254 nm y el log 12 de una dosis de esterilización excesiva (número entre paréntesis) para diversos indicadores biológicos de UV y patógenos humanos.

La Figura 5(B) es una representación esquemática de la Figura 5(A).

65 Las Figuras 6A-6K son gráficas que representan los efectos de las dosis ejemplares de radiación UV y sus respectivos efectos analizados.

La Figura 6(A) muestra la curva de fluorescencia estándar de la fluoresceína (ex./em. 490nm/520nm).
 La Figura 6(B) muestra los espectros de absorbancia de UV/Vis del Rojo allura.
 La Figura 6(C) muestra la curva de absorbancia estándar del Rojo allura.
 La Figura 6(D) muestra los espectros de absorbancia de UV/Vis del Carmín de índigo.
 La Figura 6(E) muestra la curva de absorbancia estándar del Carmín de índigo.
 La Figura 6(F) muestra los espectros de absorbancia de UV/Vis de la Eritrosina B.
 La Figura 6(G) muestra la curva de absorbancia estándar de la Eritrosina B.
 La Figura 6(H) muestra los espectros de absorbancia de UV/Vis de la Tartracina.
 La Figura 6(I) muestra la curva de absorbancia estándar de la Tartracina.
 La Figura 6(J) muestra los espectros de absorbancia de UV/Vis del Verde rápido.
 La Figura 6(K) muestra la curva de absorbancia estándar del Verde rápido.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

La presente invención proporciona un método para cuantificar diferentes dosis de desinfección con UV. En las siguientes secciones, se proporcionan descripciones detalladas de realizaciones de la invención. En la descripción de las realizaciones preferidas y alternativas se incluyen realizaciones que, a pesar de ser detalladas, solo son ejemplares, de manera que las personas versadas en la materia entenderán que existen variaciones, modificaciones y alteraciones evidentes de estas. Por lo tanto, debe entenderse que dichas realizaciones ejemplares no limitan el alcance de los aspectos de la invención subyacente. En esta explicación, los pasos del método descrito se enumeran en una secuencia lógica; sin embargo, si no se especifica lo contrario, dicha secuencia no limita de ninguna manera el orden en el que pueden ponerse en práctica.

DEFINICIONES

Tal y como se utiliza en el presente texto, 'lente oftálmica' o 'lente oftalmológica' (a veces denominada simplemente 'lente') hace referencia a cualquier dispositivo oftálmico que se encuentra en o sobre el ojo. Por ejemplo, el término 'lente' puede hacer referencia a una lente de contacto, una lente intraocular, una lente superpuesta, un inserto ocular, un inserto óptico u otro dispositivo similar mediante el cual se modifica o se corrige la visión, o a través del cual se mejora cosméticamente la fisiología ocular (por ejemplo, el color del iris) sin dificultar la visión. En algunas realizaciones, las lentes preferidas de la invención son lentes de contacto blandas y estas se fabrican a partir de hidrogeles o elastómeros de silicona, los cuales incluyen -pero no se limitan a- los hidrogeles de silicona y los fluorohidrogeles.

Sinopsis

La medición precisa de la irradiación ultravioleta (UV), especialmente en un recipiente o contenedor, es uno de los retos a los que se enfrenta la implementación general de la esterilización con UV. Los indicadores biológicos pueden proporcionar un método para determinar si una dosis de UV aplicada tiene la eficacia necesaria para conseguir la esterilización. Para superar algunos de los retos relacionados con el uso de un indicador biológico, se desarrollaron los indicadores químicos que se basan en la degradación de los alimentos, los medicamentos y los cosméticos (conocida como 'FD&C'). Para este trabajo, se determinó la relación entre la dosis de UV y la degradación de la tintura, tinte o colorante y se usó para crear curvas estándar. Si se conoce dicha relación, se puede usar la degradación de diversos colorantes como sistema de medición cuantitativo. El uso de la degradación del colorante como medición de la dosis UV es especialmente útil cuando los niveles de irradiación UV en un recipiente no se pueden medir directamente. Además, debido a la naturaleza de los tintes o colorantes FD&C, con altos niveles de color, los cambios visuales que se observan tras la irradiación del tinte pueden usarse como un indicador visual cualitativo de la dosis UV.

1. Introducción

La industria médica ha reconocido las bombillas germicidas ultravioletas (UV) como método para desinfectar y esterilizar los instrumentos médicos durante más de 60 años. Desde entonces, la luz ultravioleta (UV) se ha utilizado como agente desinfectante y de esterilización para diversos materiales sólidos, líquidos y gaseosos. Más particularmente, esta tecnología ha gozado de un amplio uso en el tratamiento del agua potable durante las dos últimas décadas.

A pesar de que las bombillas germicidas han gozado de un uso muy extendido, uno de los retos principales de usar luz UV para desinfectar o esterilizar líquidos es la determinación precisa de la dosis UV presente en el líquido. La medición de una dosis UV repetible y reproducible fue una cuestión que surgió cuando las bombillas germicidas se propusieron por primera vez como método de esterilización. Mientras que la energía por unidad de área que se imparte al recipiente de un líquido se calcula fácilmente a partir de la potencia de la fuente UV y el tiempo de exposición, calcular la energía presente en la solución no es tan sencillo. Desafortunadamente, incluso hoy en día la estandarización de las mediciones de las dosis UV continúa siendo imprecisa, de manera que se publican muchas metodologías de medición nuevas.

La dosis media (D_{avg} , por sus siglas en inglés) de luz UV en un líquido puede calcularse a partir de la

duración de la exposición (t) multiplicada por la intensidad media (I_{avg} , por sus siglas en inglés): $D_{avg} = I_{avg} \cdot t$. La intensidad media se calcula utilizando la siguiente ecuación: $I_{avg} = I_0 \cdot (1 - e^{-A \cdot L}) / (A \cdot L)$, donde A es la absorbancia del líquido por centímetro y L es la longitud de la trayectoria de la solución irradiada. Sin embargo, estos cálculos solo son válidos en el caso de una solución homogénea. La absorbancia de UV de los materiales presentes en la propia solución o en el envase que contiene la solución puede dar lugar a dosis muy desiguales cuando se someten a irradiación. Las sombras de UV que se crean pueden dar lugar a lugares en los que los microorganismos no se eliminan de forma eficaz. Recientemente, se han creado modelos/simulaciones por ordenador con el objetivo de predecir más correctamente la dosis y la eficacia de la UV en las soluciones cuyos resultados son peores que los resultados deseados. Debido a las dificultades para obtener una dosis precisa y predecir la eficacia antimicrobiana de una dosis en un líquido, existe una necesidad evidente de contar con métodos adicionales de medición cuantitativa.

Además de las mediciones cuantitativas, en los procesos de esterilización se utilizan normalmente indicadores cualitativos visuales. Si bien se han desarrollado indicadores biológicos de desinfección y esterilización con UV y generalmente se considera que estos son la prueba de esterilización más definitiva, dichos indicadores presentan algunas desventajas respecto a los indicadores químicos, concretamente la demora para obtener resultados, el coste y su potencial de contaminación. Estas desventajas pueden limitar la utilidad de los indicadores biológicos en ciertas circunstancias. Mientras que otras formas de esterilización, como la química o mediante vapor, tienen indicadores químicos eficaces, existe una falta de disponibilidad comercial de los indicadores químicos de la UV. Ha habido informes sobre sílices y microesferas marcadas fluorescentemente que se usan para determinar la dosis en los reactivos o reactores UV y se ha propuesto que la degradación de cloro libre puede ser un método para cuantificar la dosis UV en una solución. Sin embargo, todas estas técnicas de degradación química pueden cuantificar la dosis UV en solución, pero no muestran los cambios cualitativos que pueden observarse a simple vista y que son comunes a otros indicadores químicos.

En el presente texto se describe el desarrollo de un sistema de medición que se basa en la degradación de diversos cromóforos/fluoróforos y que puede usarse como método cuantitativo para determinar la dosis UV en un líquido o como indicador -químico, visual, cualitativo y que cambia de color- de la esterilización UV.

2. Materiales y métodos

2.1. Materiales

El Rojo allura AC y el Amarillo crepúsculo FCF se adquirieron a través de Tokyo Chemical Industry (Tokio, Japón). La Erioglaucina se adquirió a través de Spectrum (Gardena, California, EE UU). La Eritrosina B, la Tartracina y el Verde rápido FCF se adquirieron a través de Alfa Aesar (Ward Hill, Massachusetts, EE UU). El Carmín de índigo se adquirió a través de Amresco (Solon, Ohio, EE UU). La sal de sodio de Fluoresceína se adquirió a través de Sigma (San Luis, Misuri, EE UU). El detector germicida de UV PMA2122 certificado por el Instituto Nacional de Normas y Tecnología (NIST, por sus siglas en inglés) y el registrador de datos PMA2100 se adquirieron a través de Solar (Glenside, Pensilvania, EE UU). Las bombillas UV se adquirieron a través de LCD Lighting (Orange, Connecticut, EE UU). TableCurve2D se adquirió a través de Systat Software (San José, California, EE UU). El caldo de soja tréptico, el agar de soja tréptico, el caldo SAB-DEX y el agar SA-DEX se adquirieron a través de Northeast Laboratories (Waterville, Maine, EE UU). El #3585 de 96 pocillos de Corning Clear, las semi microcubetas de cuarzo, las placas de Petri y todos los demás materiales se adquirieron a través de VWR (Atlanta, Georgia, EE UU).

2.2. Espectros y generación de curvas estándar

Se añadió 1 mL de una solución de colorante de 10 µg/mL en agua desionizada a una cubeta de cuarzo.

Los espectros de absorbancia de UV/Vis (ultravioleta/visible) se leyeron o registraron en un M5 de Molecular Devices (Sunnyvale, California, EE UU) desde 200 hasta 800 nm cada 2 nm. Se determinó el pico de absorbancia máximo en la región visible para cada tinte o colorante.

Se añadieron por triplicado 100 µL de diversas concentraciones de solución de colorante en agua desionizada a los pocillos de la placa de 96 pocillos. La absorbancia de la placa de 96 pocillos se leyó o registró en la longitud de onda adecuada en un M5 de Molecular Devices.

2.3. Degradación de la fluorescencia de la fluoresceína

Se añadió 1 µL de diversas concentraciones de fluoresceína en agua desionizada a las cubetas de fluorescencia de cuarzo. La intensidad de la fluorescencia de cada cubeta se midió con un M5 de Molecular Devices con una excitación de 490 nm, una emisión de 520 nm y un filtro de corte de 515 nm. Las cubetas se irradiaron durante diversos intervalos de tiempo con una bombilla germicida UV con una configuración personalizada. La potencia de la bombilla, medida en µW/cm², se registró antes y después de cada ciclo de irradiación. La intensidad de fluorescencia se midió de nuevo exactamente como se ha descrito previamente. La dosis se calculó multiplicando la potencia de la bombilla por el tiempo. Las curvas de decaimiento se ajustaron con TableCurve2D usando la

ecuación DecayN 8119, cuya forma es: $y = (b^{1-d} + cdx - cx)^{1/(1-d)} + a$.

2.4. Degradación del cromóforo

Se añadió 1 µL de diversas concentraciones de cada colorante en agua desionizada a las cubetas de cuarzo. La absorbancia de cada cubeta se midió con un M5 de Molecular Devices en el pico máximo de la longitud de onda para cada colorante. Las cubetas se irradiaron durante diversos intervalos de tiempo con una bombilla germicida UV con una configuración personalizada. La potencia de la bombilla, medida en µW/cm², se registró antes y después de cada ciclo de irradiación. La absorbancia se midió de nuevo exactamente como se ha descrito previamente. La dosis se calculó multiplicando la potencia de la bombilla por el tiempo. Las curvas se ajustaron exactamente como se ha descrito previamente.

2.5. Preparación de organismos

Se cultivó un césped de organismos en una placa de Petri que contenía agar de soja tríptico para las bacterias o agar de SAB-DEX para *C. albicans* durante la noche a 35° C. Las células se extrajeron (rasparon) de la placa de Petri y se colocaron en 5 mL de tampón fosfato salino de Dulbecco (DPBS, por sus siglas en inglés) que contenía un 0,05% de Tween 80 (v/v) (TDPBS). La absorbancia de los organismos se leyó o registró y se comparó con una curva estándar. Después, las células se diluyeron hasta alcanzar la concentración adecuada, tal y como se requería en cada experimento específico.

2.6. Experimentos de determinación de la dosis de colorante y esterilización

El inóculo para cada organismo se ajustó en ~106 CFU/mL en TDPBS. Se añadieron 1,5 mL de inóculo a una semi microcubeta de cuarzo. Las cubetas se envolvieron de forma desigual utilizando envoltorio de plástico de diversos tipos y grosores para crear un recipiente con diversos grados o cantidades de absorbancia de UV. Se midió la potencia de la bombilla UV y se ajustó el tiempo de manera que cada recipiente de las cubetas se irradiara con una dosis total de 250 mW*s/cm². El número de organismos viables se enumeró tal y como se describe más adelante. Exactamente al mismo recipiente de cubetas se le añadió una solución de 10 µg/mL de Eritrosina B y se irradió exactamente como se ha descrito previamente. Tras la irradiación, la absorbancia del colorante se midió a 525 nm y la correspondiente dosis se calculó utilizando la curva ajustada generada previamente.

2.7. Enumeración de organismos

Se añadieron 100 µL de organismos a cada uno de los seis pocillos de la fila A de una placa de 96 pocillos. Se añadieron 90 µL de SAB-DEX o TSB a las filas B-H de la placa. Se creó una dilución en serie 1:10 pasando 10 µL de la fila A a la fila B y mezclando después. Este patrón o procedimiento se repitió en toda la placa. Después, se añadieron 100 µL de SAB-DEX o TSB a todos los pocillos. Las placas se incubaron durante 48 horas a 35° C. Se registró la absorbancia de cada pocillo usando un SpectraMax 384 Plus de Molecular Devices. Los pocillos se consideraron positivos o negativos para el crecimiento y la concentración original de los organismos se calculó usando el método del número más probable.

2.8. Cambios visuales en el colorante tras la irradiación UV

Se añadieron 1 mL de una solución de 10 o 100 µg/mL de Eritrosina B o una solución de 100 µg/mL de colorante de Carmín de índigo en agua desionizada a una cubeta de cuarzo. Se midió la potencia de la bombilla UV y se ajustó el tiempo para irradiar cada cubeta con la dosis especificada. Las cubetas se fotografiaron antes y después de la irradiación.

3. Resultados y análisis

3.1. Degradación del colorante tras la irradiación UV

Debido a la escasez general de indicadores químicos para la esterilización UV, se buscaron productos químicos que mostraran un cambio de color y/o fluorescencia fácilmente perceptible tras la irradiación UV. Estos tintes o colorantes químicos tenían que ser solubles en agua, ya que la mayoría de esterilizaciones UV se realizan en superficies secas o en medios acuosos; debían mostrar un elevado coeficiente de extinción, de manera que los colorantes se pudieran apreciar fácilmente a simple vista; y, preferiblemente, debían ser no tóxicos. En principio, los colorantes FD&C, con altos niveles de color, cumplían con todos los requisitos, ya que presentan niveles de toxicidad muy bajos y una elevada solubilidad en agua.

Para describir o determinar cómo se degradarían estos colorantes tras la irradiación UV, se escogió en primer lugar a la representativa fluoresceína (D&C Amarillo 8). Se irradiaron diversas concentraciones de fluoresceína en cubetas de cuarzo mediante bombillas UV germicidas a 254 nm. A lo largo del experimento se midieron la intensidad de fluorescencia, la absorbancia y la dosis UV. Las curvas se ajustaron usando TableCurve2D y se descubrió que se ajustaban mejor a las curvas de decaimiento. Tal y como se muestra en la Figura 1a, cada

concentración de fluoresceína mostró un buen ajuste a estas curvas de decaimiento.

Como en el caso de cualquier declive o decaimiento, cuando la intensidad de fluorescencia de cada curva se convirtió a un porcentaje de su valor inicial, todas las curvas se deslizaron hacia la misma curva (Figura 1b). Las curvas deslizadas o colapsadas de la absorbancia y la intensidad de fluorescencia fueron similares. Utilizar una ecuación lineal única y ajustada simplifica en gran medida la realización y el análisis de los experimentos, ya que no es necesario conocer la concentración exacta del colorante, sólo una medición inicial de su absorbancia o intensidad. Sin embargo, los valores iniciales y finales deben encontrarse dentro del rango lineal del detector.

Para identificar otros colorantes que mostraban una curva de decaimiento simple similar cuando se exponían a luz UV a 254 nm y tenían diferentes sensibilidades, de manera que podían cuantificar un rango o intervalo de dosis diferentes, se escogieron los siguientes compuestos: Eritrosina B (FD&C Rojo 3), Rojo allura (FD&C Rojo 40), Azul brillante FCF (FD&C Azul 1), Carmín de índigo (FD&C Azul 2), Tartracina (FD&C Amarillo 5), Amarillo crepúsculo FCF (FD&C Amarillo 6) y Verde rápido FCF (FD&C Verde 3). Primero se determinó el espectro de absorbancia, el pico de absorbancia de longitud de onda y la región lineal de detección de cada cromóforo.

Para los estudios sobre la degradación UV se escogió una concentración de 10 µg/ml para garantizar que cada colorante se encontraba en el rango lineal de detección. De forma similar a los estudios con fluoresceína, cada colorante se sometió a cantidades conocidas de luz UV y la absorbancia se midió a lo largo de todo el experimento. La Eritrosina B también mostró una emisión de fluorescencia significativa que podía usarse además de su absorbancia. Los valores de absorbancia se convirtieron a un porcentaje del valor inicial de absorbancia y las curvas resultantes se ajustaron con la misma curva de decaimiento que la fluoresceína.

Se descubrió que el Amarillo crepúsculo y la Erioglaucina no mostraban una curva de decaimiento simple y, por lo tanto, no se usaron en posteriores experimentos. Los colorantes restantes que sí mostraron una curva de decaimiento simple pueden verse en la Figura 2. Tal y como se muestra en la Figura 3a, la tasa de decaimiento de los diferentes colorantes que mostraron curvas de decaimiento simples abarcaba un amplio rango o intervalo de dosis UV. Se determinó que el rango de cuantificación de cada colorante se hallaba entre las dosis que producían un valor porcentual de entre un 100% y un ~20% del valor de absorbancia original (Figura 3b). Cuando se generaron las curvas estándar y se identificaron los rangos de cuantificación, estos colorantes pudieron usarse para cuantificar la cantidad de dosis UV aplicada realmente en un objeto irradiado.

3.2. Determinación de la esterilización y la dosis UV interna del recipiente

La esterilización es más eficaz cuando se aplica a un medio con una absorbancia de UV baja como el aire. Sin embargo, la mayoría de aplicaciones de esterilización, especialmente los procesos de esterilización líquidos, requieren que la luz UV pase a través de algún tipo de recipiente además del propio medio. Las inconsistencias en la absorbancia del envoltorio o envoltura, debidas a los cambios en el grosor o el tipo de material, pueden crear áreas o zonas con una dosis UV mucho menor. De forma similar, las soluciones heterogéneas también pueden dar lugar a niveles diferentes de dosis UV en su medio.

Mientras que la dosis UV que irradia el exterior de un recipiente puede medirse de forma bastante directa mediante la potencia de la bombilla, la capacidad para medir la dosis acumulativa media en un recipiente no es tan fácil de obtener. Sin embargo, con un colorante soluble que puede colocarse en un recipiente puede determinarse la dosis media aproximada que se obtiene en dicho recipiente tras la irradiación UV.

Para estudiar el impacto de la absorbancia de los materiales desiguales sometidos a esterilización, las cubetas de cuarzo se envolvieron de forma desigual con diversas hojas o envoltorios de plástico. Estos envoltorios tenían arrugas, pequeños pliegues y huecos que creaban diferencias en la absorbancia de luz UV. Se utilizaron diez envoltorios diferentes y se organizaron en grupos con un promedio decreciente de transmisión UV (Figura 4a).

A las cubetas envueltas se les añadió 1,5 mL de una solución de organismos de ~ 1x10⁶ CFU/mL o una solución de colorante de Eritrosina B de 10 µg/mL. Tanto los organismos como el colorante se suspendieron en tampón fosfato salino de Dulbecco modificado que contenía un 0,05% de Tween-80 (TDPBS). El TDPBS se usó para evitar que los organismos formaran grandes aglomeraciones y también para aplicar una absorbancia UV significativa a la propia solución. Después, las cubetas llenas y envueltas se irradiaron con una dosis externa constante -medida según la potencia de la bombilla- y se determinó la cantidad de organismos supervivientes o la dosis interna -medidas según la reducción de la absorbancia del colorante-.

Para este experimento de esterilización se escogieron la bacteria gram negativa E. coli, la bacteria gram positiva Staphylococcus aureus y la Candida albicans de la levadura. A partir de datos publicados se obtuvieron o calcularon dosis UV que proporcionan una esterilización excesiva de 12 log. Debido a las diferencias en la metodología y a las dificultades inherentes a la medición de dosis UV, en la literatura existía una gran variación respecto a las dosis de esterilización excesiva, de manera que las dosis de E. coli oscilaban entre 2,5 y 98 mW*s/cm², las de S. aureus oscilaban entre 2,7 y 174 mW*s/cm² y las de C. albicans oscilaban entre 26 y 537 mW*s/cm².

Teniendo en cuenta los diversos valores publicados y nuestros propios datos no publicados, se escogió una dosis de 100 mW*s/cm² para las bacterias y una dosis de 250 mW*s/cm² para *C. albicans*.

Tal y como puede observarse en las Figuras 4b-d, la dosis interna calculada fue menor que la dosis aplicada y, a medida que la transmisión del envoltorio plástico disminuía (los números de los grupos de recipientes más altos tienen una transmisión UV más baja, tal y como se muestra en la Figura 4), la dosis interna mostraba una disminución similar. La dosis interna más baja, incluso en una cubeta sin envolver (grupo de recipientes 1), se debe seguramente a la mayor absorbancia de la propia solución de TDPBS (casi un 20% de disminución de la transmisión por cm). Un aumento de la distancia desde la bombilla y la pequeña absorbancia de la propia cubeta contribuyen a la dosis interna más baja.

Los grupos de recipientes que mostraron una alta transmisión y las correspondientes dosis internas más altas mostraron una esterilización completa para los tres organismos (grupos de recipientes 1-4). Sin embargo, a medida que la absorbancia del envoltorio plástico aumentaba, la dosis interna caía con el tiempo a un nivel en el que algunos de los organismos podían sobrevivir (grupos de recipientes 5-7). Una vez que se alcanzó este punto de transición, el número de organismos supervivientes aumentó a medida que la dosis interna disminuía aún más (grupos de recipientes 8-11). Los organismos supervivientes no estaban distribuidos de manera uniforme entre las réplicas de cada muestra debido a las desigualdades de los envoltorios plásticos, lo que dio lugar a una elevada variabilidad.

3.3. Degradación del colorante como indicador UV químico y visual

Además de usarse como herramienta de medición cuantitativa, la degradación de los colorantes también puede usarse de una forma más cualitativa, como indicador químico visual de la dosis UV. Puesto que se escogieron colorantes FD&C, con altos niveles de color, la transición en el color a medida que el colorante se degrada puede utilizarse como indicador visual. Para mostrar los cambios visuales, diversas concentraciones de colorantes diferentes se irradiaron con dosis conocidas de luz UV, de manera que se tomaron imágenes de cada colorante a lo largo del proceso de irradiación. Se escogieron una solución de Eritrosina B de 10 y 100 µg/mL y una solución de Carmín de índigo de 100 µg/mL como candidatos representativos, ya que mostraron cambios de color visuales adecuados en el rango de las dosis analizadas.

Tal y como se muestra en las Figuras 5(A) y (B), la solución de Eritrosina B de 10 µg/mL mostró el cambio más visual con las dosis UV más bajas, con una diferencia brusca de color entre 0 y 500 mW*s/cm² y una pérdida de color absoluta a 1000 mW*s/cm². La solución de Carmín de índigo de 100 µg/mL fue algo menos sensible y mostró un ligero cambio de color a 500 mW*s/cm², un cambio brusco de color a 1000 mW*s/cm² y una pérdida de color absoluta a 2500 mW*s/cm². Por último, la solución de Eritrosina B de 100 µg/mL, más concentrada, permitió cambios visuales con dosis de luz UV más elevadas, ya que la pérdida de color absoluta no se observó hasta alcanzar una dosis de 5000 mW*s/cm². Los colorantes menos sensibles a la UV podrían usarse como indicadores visuales si se requieren dosis UV más elevadas.

3.4. Dosis de esterilización UV excesiva de log 12 para microorganismos

Como referencia, los valores de las dosis de esterilización excesiva de log 12 para diversas bacterias, hongos, virus y protozoos se obtuvieron o calcularon a partir de datos publicados (31). Estos organismos se escogieron por su uso como indicadores biológicos para la esterilización UV o porque son patógenos humanos conocidos. En general, la mayoría de las bacterias, virus y protozoos se esterilizan con menos de 500 mW*s/cm² de UV, pero algunos organismos muestran mayor resistencia. Los hongos, especialmente en su forma de espora, son más resistentes a la esterilización UV que los demás grupos de organismos, de manera que la mayoría de organismos se esterilizan entre 500 mW*s/cm² y 2500 mW*s/cm². Puesto que la gran mayoría de organismos se esterilizan en un intervalo de entre 0 y 5000 mW*s/cm², la Eritrosina B y/o el Carmín de índigo pueden usarse como un indicador químico, cualitativo, visual y eficaz para determinar si la dosis UV es suficiente para la esterilización.

4. Conclusiones

Se analizaron siete colorantes FD&C y el colorante de fluoresceína D&C para determinar si su degradación de absorbancia y/o fluorescencia tras la irradiación con luz UV a 254 nm podía usarse como medida cuantitativa de la dosis UV. Seis de los ocho colorantes mostraron curvas de decaimiento simples tras la irradiación UV. Se crearon las curvas de degradación UV estándar de estos seis colorantes y todos ellos pudieron utilizarse para determinar la dosis UV media aplicada a una solución. Debido a las diferentes sensibilidades de los colorantes, pudieron cuantificarse diferentes rangos de dosis UV.

Para mostrar el potencial de medir directamente la dosis UV en un recipiente, algunas cubetas envueltas de forma desigual con diversos plásticos que absorben UV se irradiaron con una dosis constante de energía UV que era equivalente a una dosis de esterilización excesiva de log 12. Debido a la estructura de los recipientes de las cubetas, la cantidad de energía UV que puede penetrar en el espacio interior es desconocida y resulta difícil calcularla de forma absoluta. A estos recipientes se les añadió el colorante Eritrosina B o los microorganismos *E.*

coli, S. aureus o C. albicans. El colorante se utilizó para cuantificar la dosis UV interna o se determinó el número de organismos supervivientes. Se demostró que la pérdida de la dosis interna se correspondía con el aumento del número de organismos supervivientes a pesar de que la energía UV total aplicada al exterior de los recipientes no cambiara.

Por último, se estudiaron los cambios visuales de los colorantes tras la irradiación UV. Los dos colorantes más sensibles, Eritrosina B y Carmín de índigo, mostraron buenos cambios de color visuales en las dosis en un rango de entre 0 y 5000 mW*/cm², dependiendo de su concentración. Podían usarse colorantes adicionales si se requerían dosis más grandes. Sin embargo, puesto que la dosis de esterilización excesiva de log 12 para los microorganismos más importantes es de menos de 5000 mW*/cm², estos dos colorantes deberían poder aplicarse a la gran mayoría de microorganismos.

En resumen, las dificultades para medir la dosis UV absoluta y la actual escasez de indicadores químicos disponibles comercialmente para la esterilización UV hacen necesario contar con nuevos métodos cuantitativos y cualitativos. La capacidad para utilizar la degradación de los colorantes FD&C como herramienta de medición cuantitativa y como indicador visual cualitativo hace que estos colorantes sean una buena opción como indicadores químicos de UV.

Conclusión

Se han descrito diversas realizaciones de la presente invención. Esta especificación contiene muchas descripciones de características que son específicas a realizaciones particulares de la presente invención.

Por lo tanto, se han descrito realizaciones particulares del tema tratado. Otras realizaciones se encuentran dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un método para cuantificar dosis desinfectantes ultravioletas que son adecuadas para esterilizar una lente oftálmica utilizando uno o más indicadores aditivos, que comprende:

5 añadir uno o más indicadores a una solución acuosa, de manera que estos indicadores son solubles en agua y se disuelven en la mencionada solución, y de manera que comprenden al menos un cromóforo o un fluoróforo (o ambos) que pueden degradarse tras una irradiación ultravioleta;

10 aplicar una dosis de radiación ultravioleta a la mencionada solución, que contiene uno o más indicadores, con una intensidad y un periodo de tiempo controlados; y

 obtener una información o 'feedback' a partir de la degradación de uno o más de los indicadores.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1(A)

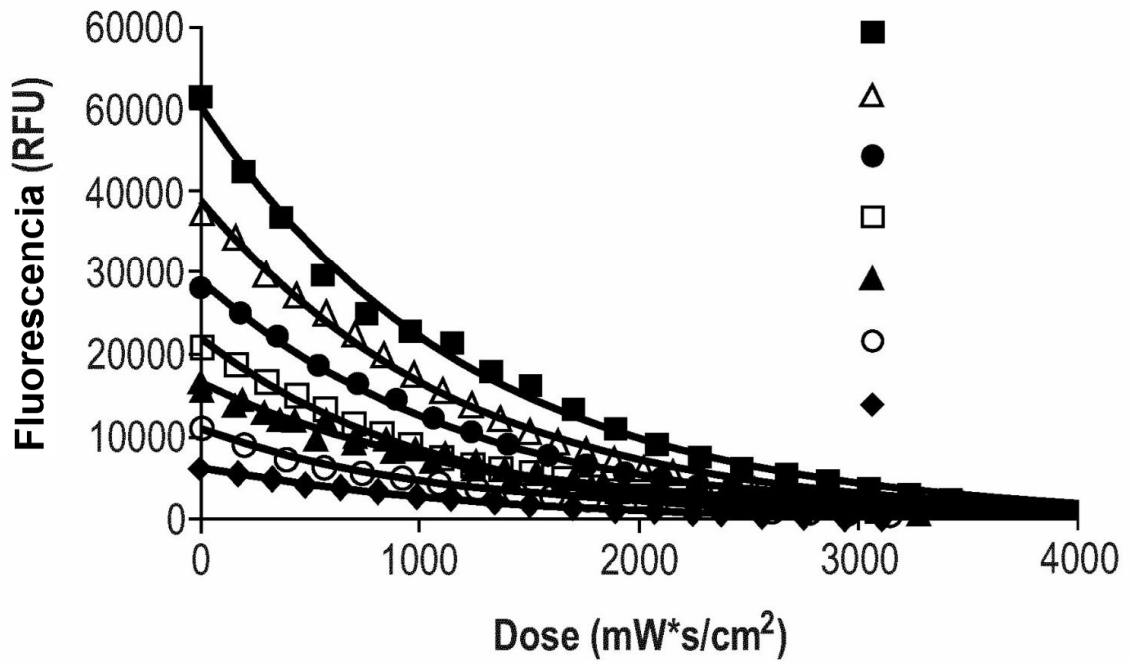


FIG. 1(B)

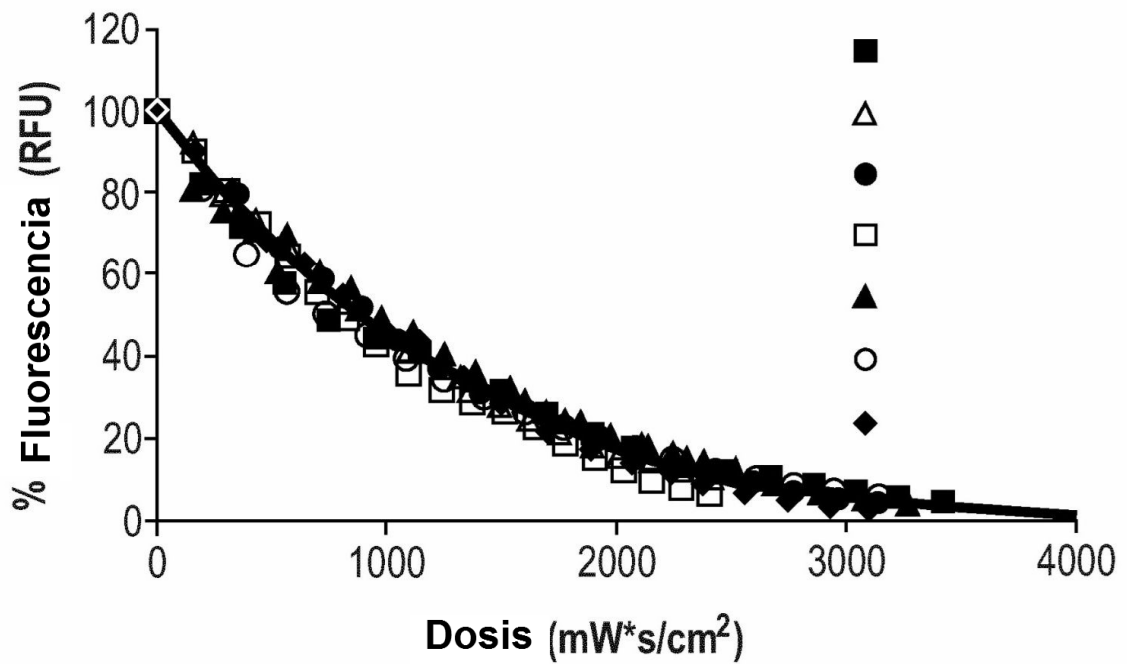
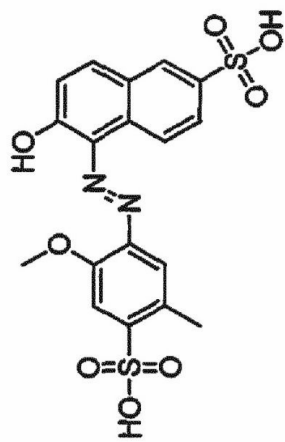
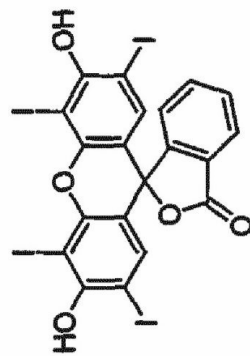


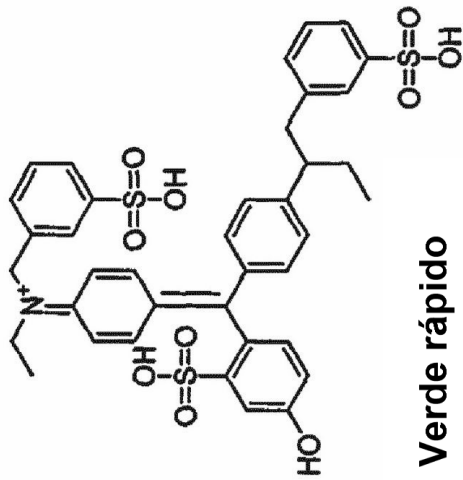
FIG. 2



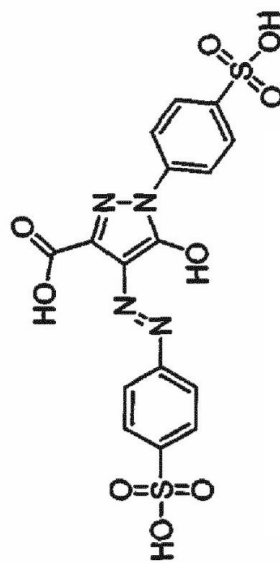
Rojo allura
FD&C Rojo 40



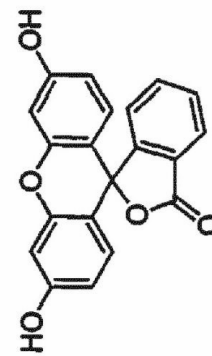
Eritrosina B
FD&C Rojo 3



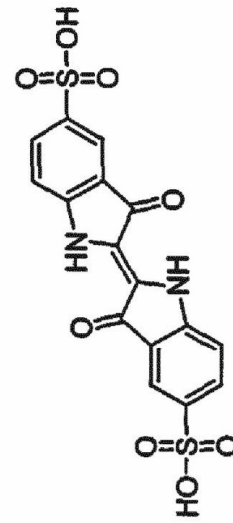
Verde rápido
FD&C Verde 3



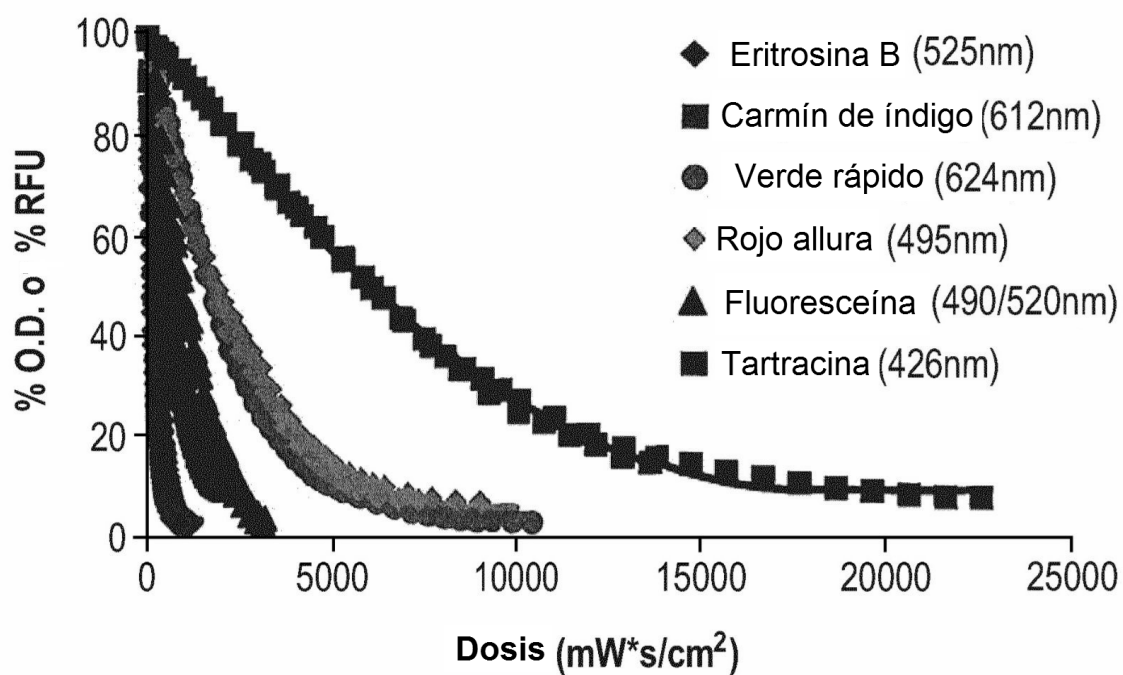
Tartracina
FD&C Amarillo 5



Fluoresceína
D&C Amarillo 8



Carmin de índigo
FD&C Azul 2

FIG. 3(A)**FIG. 3(B)**

Dye	intervalo de cuantificación de la(s) dosis (mW*s/cm ²)
Eritrosina B	0 - 400
Carmín de índigo	0 - 1200
Fluoresceína	0 - 1800
Verde rápido	0 - 3500
Rojo allura	0 - 4000
Tartracina	0 - 12,000

FIG. 4(A)

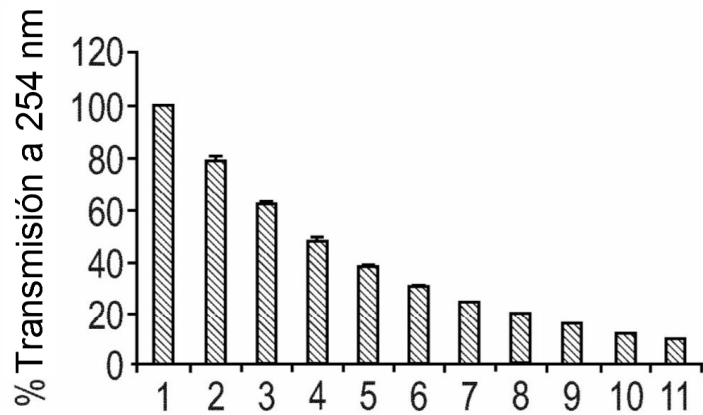


FIG. 4(B)

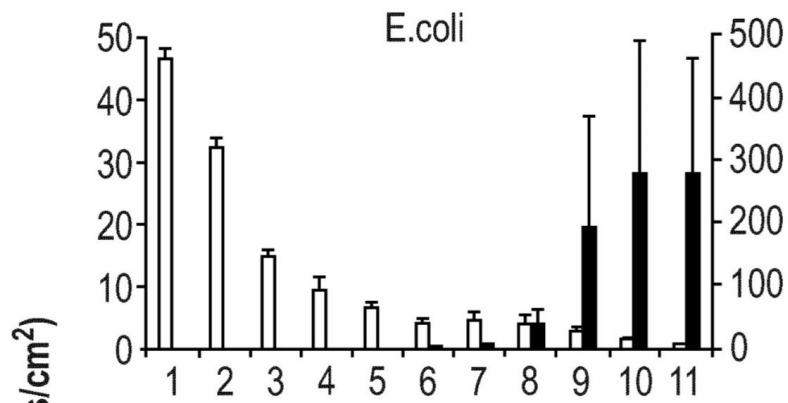


FIG. 4(C)

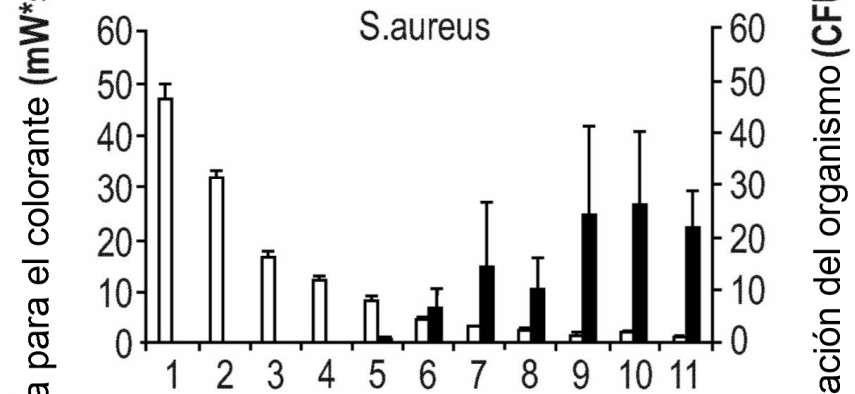


FIG. 4(D)

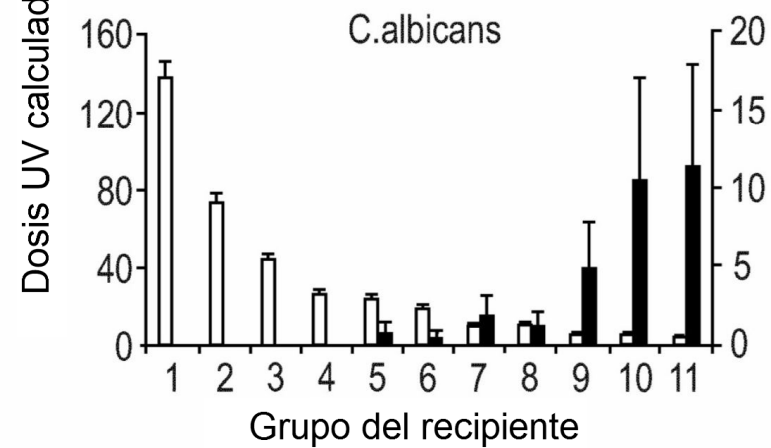


FIG. 5(A)

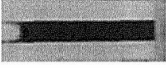
Eritrosina B 10 µg/mL	Carmin de índigo 100 µg/mL	Eritrosina B 100 µg/mL	Dosis mW*s/cm ²	Bacterias	Hongo	Protozoos	Virus
			0	Vibrio cholerae (20) Escherichia Coli (43) Mycobacterium tuberculosis (47) Staphylococcus aureus (50) Pseudomonas aeruginosa (82) Serratia marcescens (126) Francisella tularensis (332) Salmonella typhimurium (354) Bacillus anthracis - spore (493) Streptococcus pneumoniae (562)	Blastomyces dermatitidis (168) Candida albicans (250) Fusarium solani - spore (376) Aspergillus flavus - spore (600) Aspergillus amstelodami - spore (650)	Cryptosporidium parvum (20) Giardia lamblia (29)	Herpes Simplex 2 (53) Herpes Simplex 1 (60) Hepatitis A (126) poliovirus de tipo 1 (133) Espstein-Barr (194) bacteriófago MS2 (288) VIH (336) Adenovirus (560) Poliovirus (695) citomegalovirus humano (790)
			500				
			1000				
			2500	Bacillus atrophaeus - spore (1588) Bacillus thuringiensis (2763)	Claosporium trichoides (1344) Scopularopsis brevicaulis (1506) Scopularopsis brevicaulis (1506) Aspergillus niger - spore (1608) Aspergillus fumigatus (1665)	Acanthameoba castellani (1198)	SV40 (1104)
			5000		Rhizopus nigricans - spore (3600) Stachybotrys chartarum (6690)		SARS-CoV (3655)

FIG. 5(B)

Erythrosin B 10 µg/mL	Indigo Carmine 100 µg/mL	Erythrosin B 100 µg/mL	Dose mW*s/cm ²	Bacteria	Fungus	Protozoa	Virus
			0	Vibrio cholerae (20) Escherichia Coli (43) Mycobacterium tuberculosis (47) Staphylococcus aureus (50) Pseudomonas aeruginosa (82) Serratia marcescens (126)	Blastomyces dermatitidis (168) Candida albicans (250) Fusarium solani - spore (376)	Cryptosporidium parvum (20) Giardia lamblia (29)	Herpes Simplex 2 (53) Herpes Simplex 1 (60) Hepatitis A (126) Poliovirus type 1 (133) Espstein-Barr (194) Bacteriophage MS2 (288) HIV (336)
			500	Francisella tularensis (332) Salmonella typhimurium (354) Bacillus anthracis - spore (493) Streptococcus pneumoniae (562)	Aspergillus flavus - spore (600) Aspergillus amstelodami - spore (650)		Adenovirus (560)
			1000				6/12 Polyomavirus (695) Human Cytomegalovirus (790)
			2500	Bacillus atrophaeus - spore (1588) Bacillus thuringiensis (2763)	Cladosporium trichoides (1344) Scopulariopsis brevicaulis (1506) Scopulariopsis brevicaulis (1506) Aspergillus niger - spore (1608) Aspergillus fumigatus (1665)	Acanthamoeba castellanii (1198)	SV40 (1104)
			5000		Rhizopus nigricans - spore (3600)		SARS-CoV (3655)
					Stachybotrys chartarum (6690)		

FIG. 5(B)

Eritrosina B 10 µg/mL	Carmín de índigo 100 µg/mL	Eritrosina B 100 µg/mL	Dosis mW*s/cm ²	Bacterias	Hongo	Protozoos	Virus
			0	Vibrio cholerae (20) Escherichia Coli (43) Mycobacterium tuberculosis (47) Staphylococcus aureus (50) Pseudomonas aeruginosa (82) Serratia marcescens (126)		Cryptosporidium parvum (20) Giardia lamblia (29)	Herpes Simplex 2 (53) Herpes Simplex 1 (60) Hepatitis A (126) Poliovirus type 1 (133) Espiein-Barr (194) Bacteriophage MS2 (288) HIV (336)
			500	Francisella tularensis (332) Salmonella typhimurium (354) Bacillus anthracis - spore (493) Streptococcus pneumoniae (562)	Blastomyces dermatitidis (168) Candida albicans (250) Fusarium solani - spore (376)		Adenovirus (560)
			1000		Aspergillus flavus - spore (600) Aspergillus amstelodami - spore (650)	Acanthameoba castellani (1198)	Polyomavirus (695) Human Cytomegalovirus (790)
			2500	Bacillus atrophaeus - spore (1588) Bacillus thuringiensis (2763)	Cladosporium irichoides (1344) Scopulariopsis brevicaulis (1506) Scopulariopsis brevicaulis (1506) Aspergillus niger - spore (1608) Aspergillus fumigatus (1665)		SV40 (1104)
			5000		Rhizopus nigricans - spore (3600) Stachybotrys chartarum (6690)		SARS-CoV (3655)

FIG. 6(A)

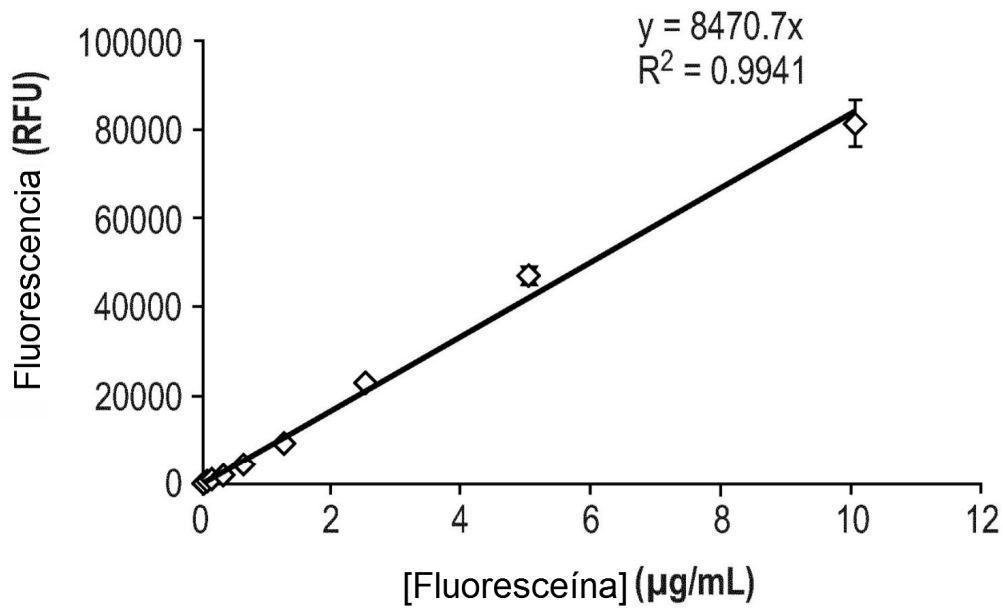


FIG. 6(B)

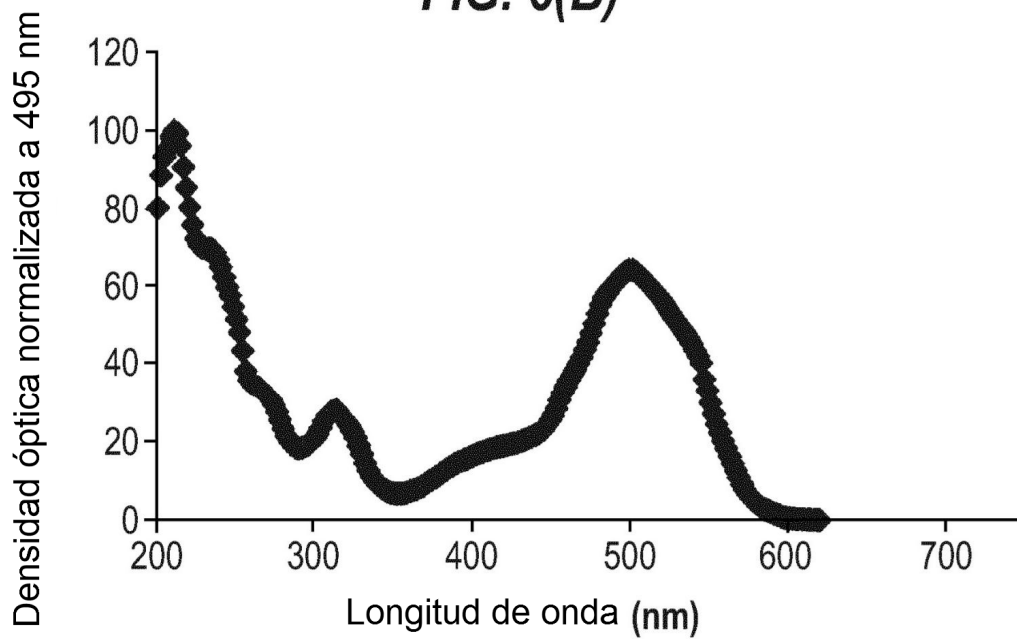


FIG. 6(C)

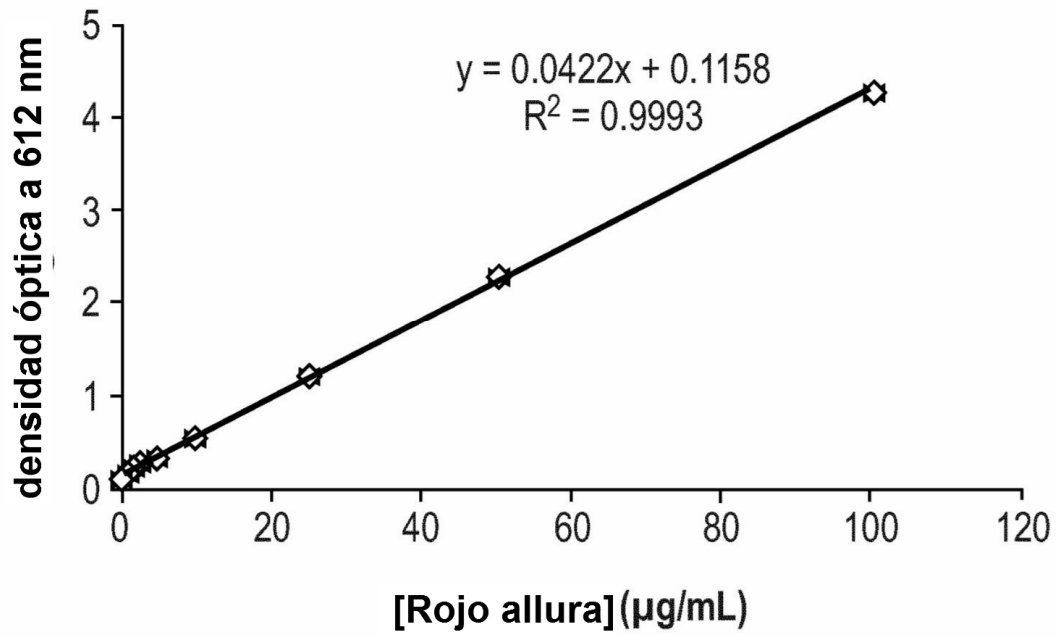


FIG. 6(D)

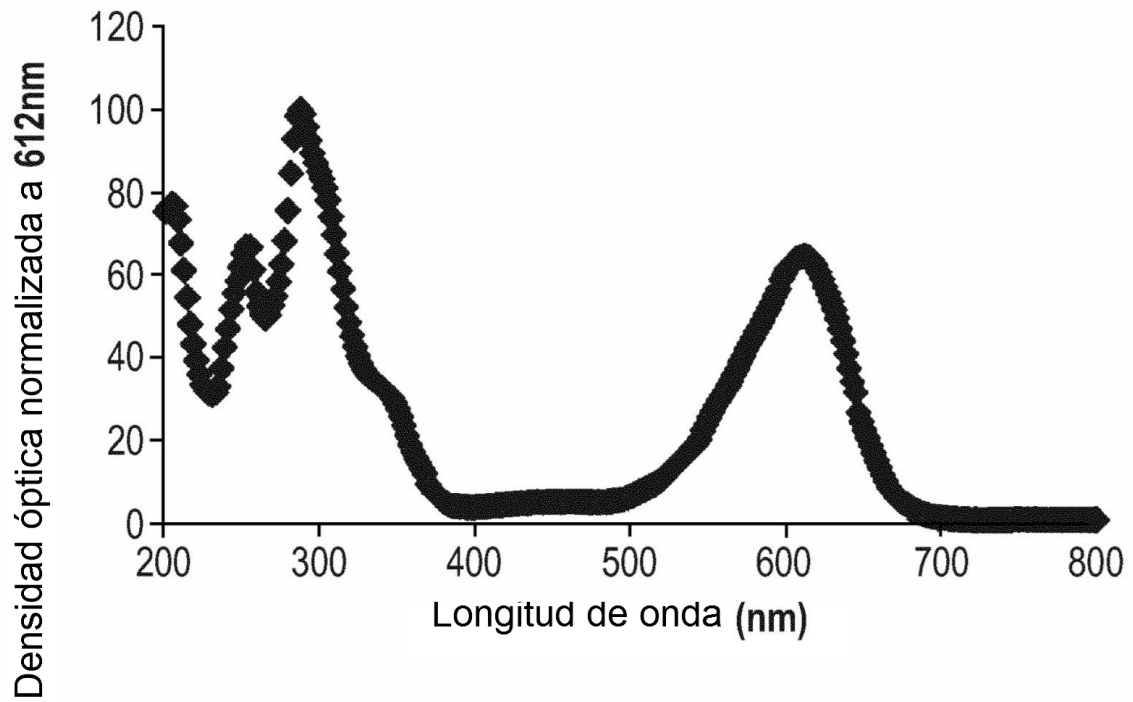


FIG. 6(E)

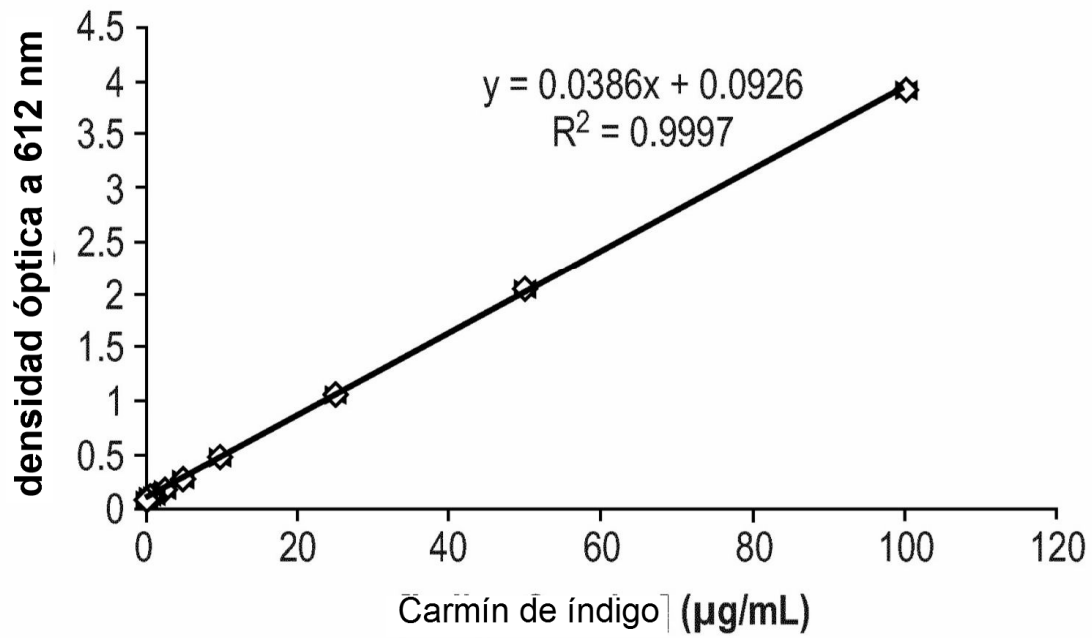


FIG. 6(F)

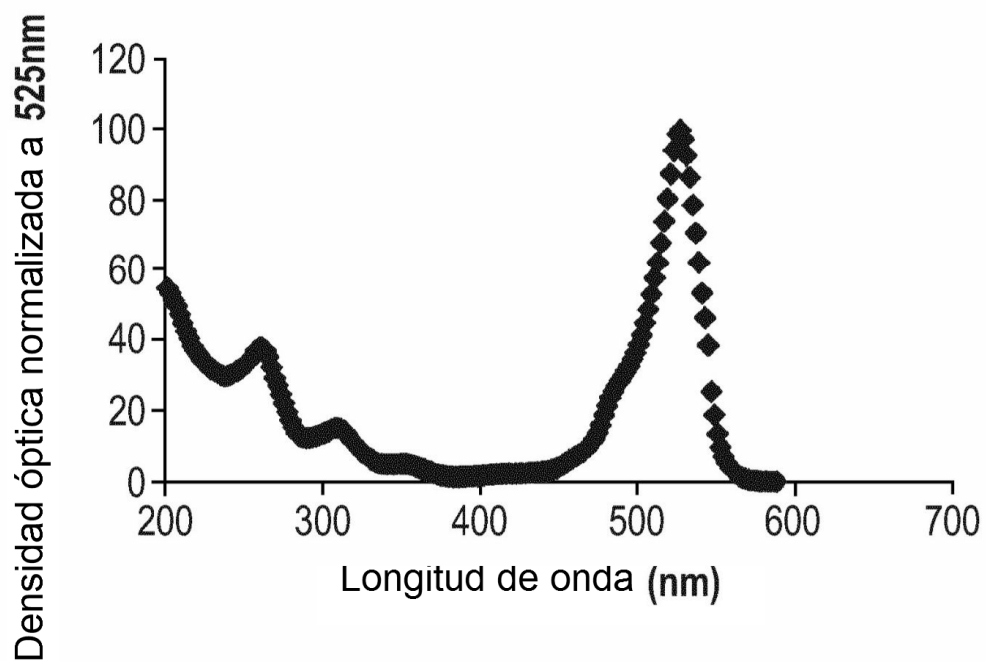


FIG. 6(G)

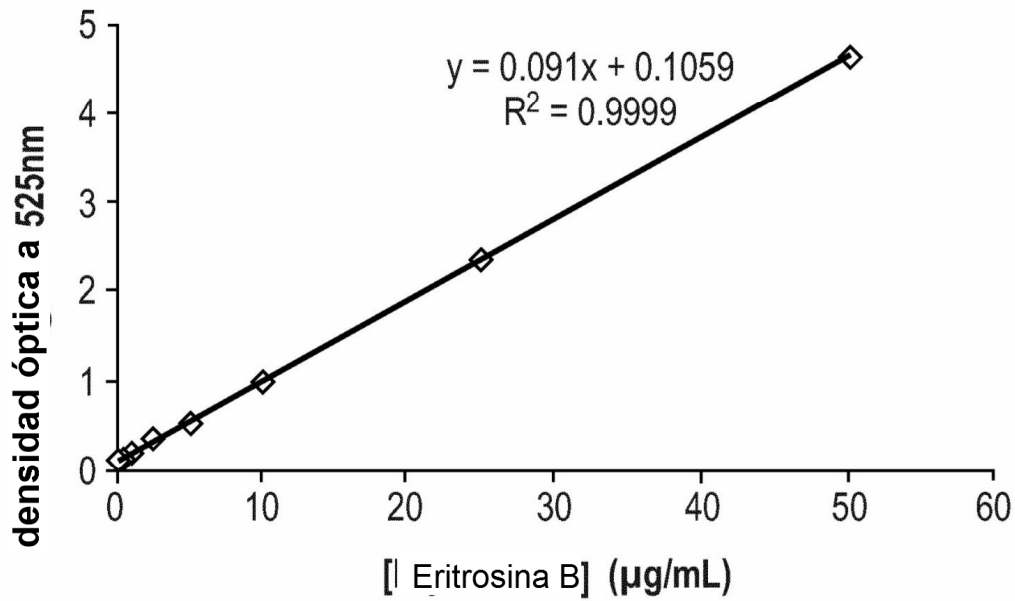


FIG. 6(H)

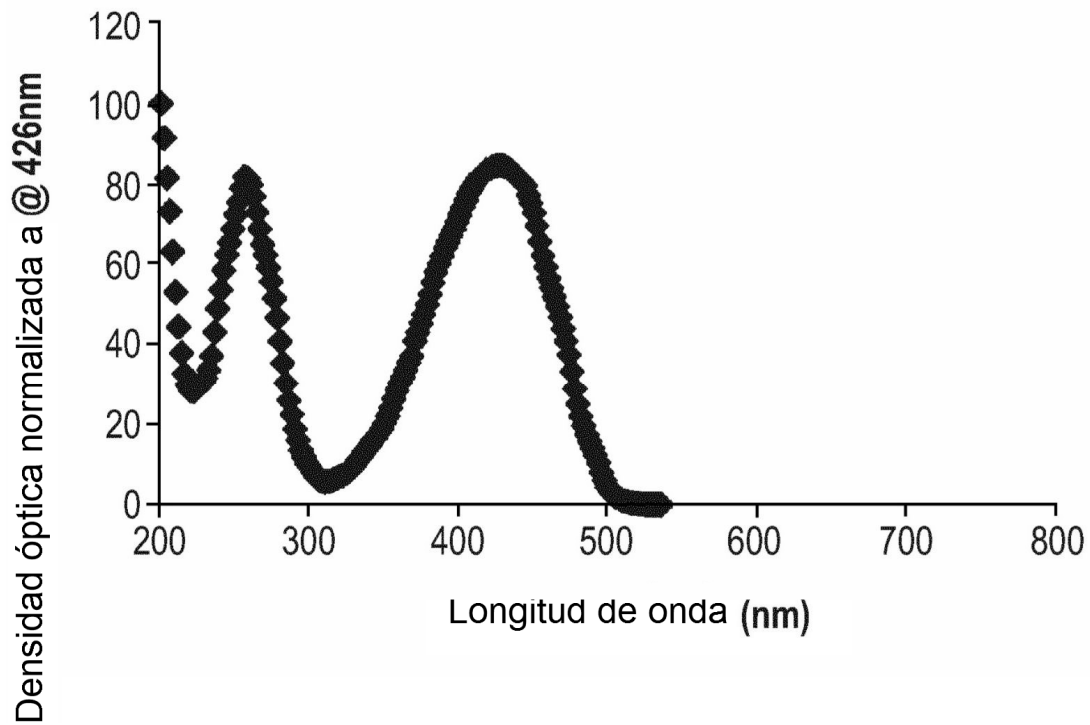


FIG. 6(I)

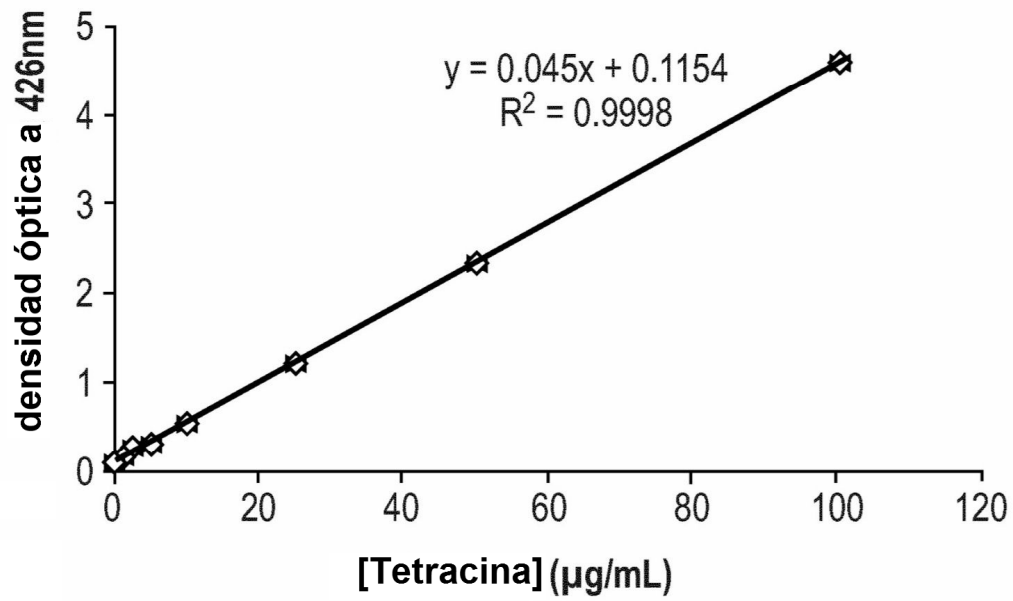


FIG. 6(J)

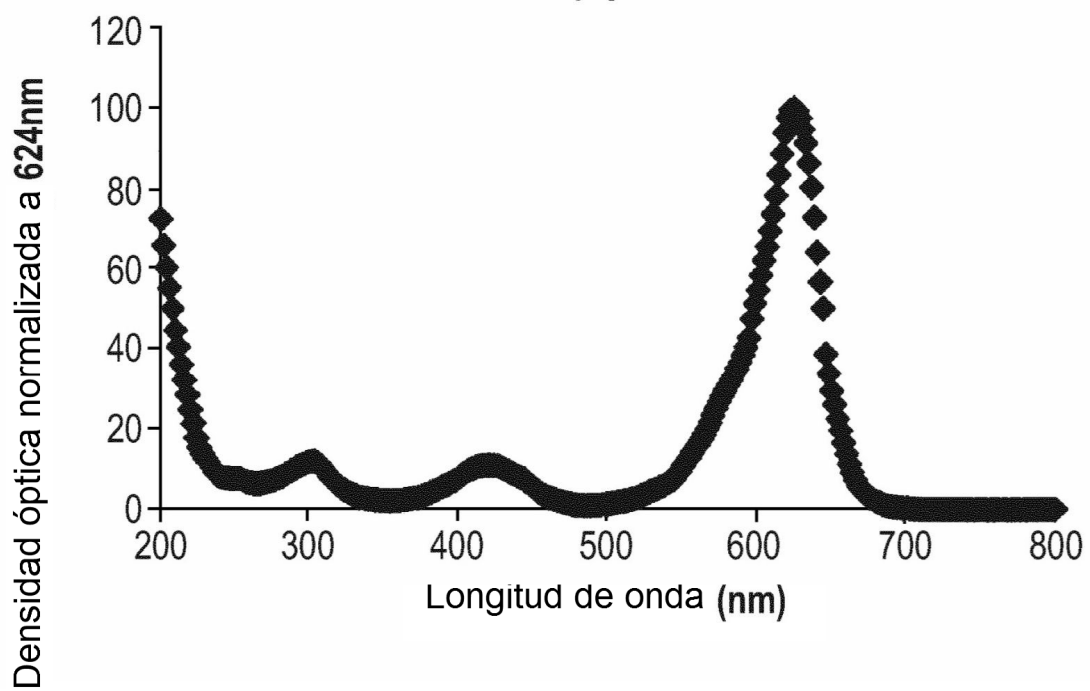


FIG. 6(K)

