

## AN ALTERNATIVE TO FLUORESCEIN FOR MEASURING INTRAOCULAR PRESSURE BY MEANS OF THE GOLDMANN TONOMETER

*Un'alternativa alla fluoresceina per la misurazione del tono oculare mediante il tonometro di Goldmann*

**Maurizio Rolando, Francesca Bruzzone**

Ocular Surface & Dry Eye Center, ISPRES Oftalmica Istituto di Medicina Oftalmica, Genova

### ABSTRACT

**Objective:** The recent European Union regulation about drugs and medical devices, stating that any chemical product used for diagnostic purposes, such as intraocular pressure (IOP) measurement by applanation tonometry, has to be registered as a drug, created several difficulties to ophthalmologists, opticians fitting contact lenses and optometrists. Furthermore, the medical device fluorescein in paper strips is considered a drug just like the sodium fluorescein used for Intra venous injections, this has created difficulties in distribution because of economical and regulatory burdens, but practically forbid their usage to non-physicians operators. Riboflavin could represent a possible alternative to fluorescein for the staining of the tears, able to dissolve in the tears, and to give a similar fluorescence response, with a very good safety profile and for which a reasonable experience in ophthalmology was available.

The level of fluorescence of a 3% riboflavine eye drop compound (DROptest Servimed, Roma, Italia) when used for IOP measurement and then was compared to the one obtained by using fluorescein 2% eye drops (Fluorofta SOOFT, Montegiorgio FM Italia).

### RIASSUNTO

**Obiettivi:** la colorazione delle lacrime attraverso la stimolazione della fluorescenza di un composto aggiunto (es. fluoresceina) è una procedura imprescindibile nella misurazione della pressione oculare attraverso il tonometro di Goldmann. La classificazione del dispositivo medico fluoresceina sodica in strisce come farmaco, da parte della Comunità Europea ne ha reso più difficile la distribuzione sul mercato per motivi burocratico economici.

È quindi naturale che si sia cercata una possibile alternativa alla fluoresceina per la diagnostica della distribuzione lacrimale, cercando di identificare una sostanza capace di dare una simile risposta di fluorescenza, che fosse solubile nelle lacrime, con un ottimo profilo di sicurezza e per la quale vi fosse in campo oftalmologico una ragionevole esperienza d'uso. Ci è quindi sembrato interessante valutare la possibilità di utilizzare la riboflavina in collirio come colorante fluorescente per la routinaria misurazione del tono oculare attraverso il tonometro di Goldmann.

**Procedure:** in 20 pazienti consecutivi, il tono oculare è stato misurato dopo l'instillazione in od di una formulazione in collirio Fluoresceina 0,2% e in os dopo l'instillazione di un collirio a base di riboflavina in tutti i pazienti in entrambi gli occhi.

### CORRESPONDING AUTHOR

Maurizio Rolando  
Ocular Surface  
& Dry Eye Center  
ISPRES Oftalmica Istituto di  
Medicina Oftalmica  
Via Antiochia 29 r.  
16121 Genova  
Ph +39 010 540980  
Fax +39 010 3629764  
maurizio.rolando@gmail.com

### KEY WORDS

Fluorescein, Riboflavin,  
tear staining, applanation  
tonometry

### PAROLE CHIAVE

fluoresceina, riboflavina,  
colorazione lacrimale,  
tonometria applanazione



**Methods:** In 20 patients a digital image at the very moment of pressure measurement was taken. The image was then analyzed by means of the "Image-J" software for evaluating the levels of luminosity on 3 locations of the upper arc of Goldmann applanation tonometry sinusoid.

The right eye of one patient was colored by Fluorescein eye drops while the left eye was colored by Riboflavin eye drop preparation.

**Results:** Two tails Student "t" test wasn't able to show any difference between the level of fluorescence intensities between the two compounds ( $p=0,662674$ ) suggesting that there is no significant difference of using any of the two in IOP measuring.

**Conclusions:** The formulation containing riboflavin (DROptest) appears to represent an appropriate substitute of fluorescein for the measurement of intraocular pressure by means of Goldman applanation tonometry.

## INTRODUCTION AND OBJECTIVE

Staining of the tears by means of a fluorescent compound (e.g. fluorescein) for a long time now has been a main cornerstone of ocular pathologies, especially of the ocular surface. In particular is mandatory for measuring intraocular pressure by means of the Goldmann applanation tonometer, which is by far the most frequently used and reliable system of measure available today<sup>1</sup>.

Furthermore, the use of tear distribution evaluation by means of fluorescence stimulation of a dissolved compound is a routine and recognized fundamental procedure for the final customization of the fitting of contact lenses<sup>2</sup>.

The recent European Union regulation about drugs and medical devices, stating that any chemical product

*Al momento della misurazione del tono l'immagine alla lampada a fessura è stata fotografata mediante un sistema digitale. I livelli relativi di luminosità, alla stimolazione della fluorescenza con la luce di Wood, in 3 porzioni del semicerchio superiore dell'anello fluorescente di misurazione sono stati valutati mediante il sistema Image J; è stato quindi valutato il significato statisticamente delle eventuali differenze tra i due occhi.*

**Risultati:** l'analisi con il test "t" di Student a 2 vie non ha mostrato differenze significative tra le medie delle intensità luminose dei due gruppi ( $p=0,662674$ ) negando quindi una differenza di comportamento dei due preparati nello stimolare la fluorescenza del fluido lacrimale alla luce di Wood nella misurazione della pressione oculare.

**Conclusioni:** la formulazione a base di riboflavina DROptest appare un sostituto appropriato della fluoresceina, nella misurazione del tono oculare con lo strumento ad applanazione di Goldmann.

## INTRODUZIONE E OBIETTIVI

*La colorazione delle lacrime attraverso la stimolazione della fluorescenza di un composto aggiunto (es. fluoresceina) è da molti anni un caposaldo della diagnostica delle patologie oculari in genere, in particolare delle patologie della superficie oculare ed è una procedura imprescindibile nella misurazione della pressione oculare attraverso il tonometro di Goldmann, di gran lunga il più utilizzato ed il più affidabile sistema di misurazione per questo parametro<sup>1</sup>.*

*L'uso della valutazione della distribuzione lacrimale, identificata attraverso la stimolazione della fluorescenza di un composto disciolto, è inoltre una procedura routinaria e riconosciuta fondamentale nella rifinitura dell'applicazione delle lenti a contatto<sup>2</sup>.*

*La recente Direttiva Europea sui farmaci*

used for diagnostic purposes has to be registered as a drug, created several difficulties to ophthalmologists, opticians fitting contact lenses and optometrists. As a matter of fact the medical device fluorescein in paper strips is considered a drug just like the sodium fluorescein used for intra venous injections, this has created difficulties in distribution because of economical and regulatory burdens, but practically forbid their usage to non-physicians operators.

It is natural then that people has been looking for a possible alternative to fluorescein for the diagnosis of tear distribution, trying to identify a compound able to dissolve into the tears, able to give a similar fluorescence response, with a very good safety profile and for which a reasonable experience in ophthalmology was available.

Fluorescence is the emission of light by a substance that has absorbed light or other electromagnetic radiation.

It is a form of luminescence. In most cases, the emitted light has a longer wavelength, and therefore lower energy, than the absorbed radiation.

Fluorescent materials would cease to glow immediately upon removal of the excitation source. Hence, it is not a persistent phenomenon.

An incident radiation (in the wood lamp are ultra violet rays) will excite the atoms of the fluorescent substance, shifting an electron to a higher energetic external (orbital) level. After few nanoseconds the excited electron, passing through different stages of intermediate energy, will return to its previous energetic level. During this process it will produce a light of a wider wavelength compared to the incident light. This is called fluorescence<sup>3</sup>.

*e sui presidi medici, secondo la quale ogni sostanza chimica utilizzata a scopo diagnostico va registrata come farmaco ha creato non poche difficoltà agli oftalmologi, agli ottici applicatori di lenti a contatto ed agli optometristi. Infatti, la classificazione del dispositivo medico fluoresceina sodica in strisce come farmaco al pari della fluoresceina sodica iniettabile endovena, oltre a renderne più difficile la distribuzione sul mercato per motivi burocratico-economici, praticamente ne impedisce l'uso ai non laureati in Medicina. È quindi naturale che si sia cercata una possibile alternativa alla fluoresceina per la diagnostica della distribuzione lacrimale, cercando di identificare una sostanza capace di dare una simile risposta di fluorescenza, che fosse solubile nelle lacrime, con un ottimo profilo di sicurezza e per la quale vi fosse in campo oftalmologico una ragionevole esperienza d'uso.*

*La fluorescenza è la proprietà di alcune sostanze di riemettere (nella maggior parte dei casi a lunghezza d'onda maggiore e quindi a energia minore) le radiazioni elettromagnetiche ricevute, in particolare di assorbire radiazioni nell'ultravioletto ed emetterla nel visibile.*

*Una radiazione incidente (nell'esempio della lampada di Wood si tratta di raggi ultravioletti) eccita gli atomi della sostanza fluorescente, promuovendo un elettrone a un livello energetico (vedi orbitale) meno legato, più energetico e quindi più "esterno". Entro poche decine di nanosecondi, l'elettrone eccitato torna al livello precedente in due o più fasi, passando cioè per uno o più stati eccitati a energia intermedia. Tutti i decadimenti tranne uno sono, di solito, non radiativi, mentre l'ultimo emette luce a lunghezza d'onda maggiore rispetto alla radiazione incidente (non necessariamente nello spettro visibile): questa luce è detta "fluorescenza"<sup>3</sup>.*



Fig. 1

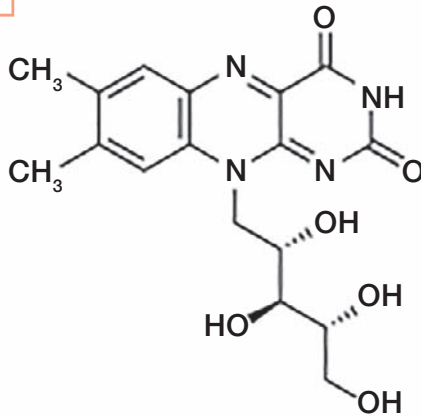


Fig. 1

Riboflavin formole.

Formula della riboflavina.

Fluorescence observation is usually amplified by the use of filters able to cut the incident light in order only to leave the high-energy portion (excitation filter) and to observe only the fluorescent light by using another filter (barrier filter). Very often the presence of both filters is not mandatory.

In the slit lamp used in ophthalmology, usually a cobalt filter is inserted in order to excite the 550nm fluorescence of the fluorescein staining. Some slit lamps provide also the barrier filter in the observation pathway, usually a yellow filter.

### Fluorescein

The fluorescein is a highly hydrophilic dye and stains water<sup>4</sup>.

From a theoretical point of view the fluorescein does not stain normal cells.

The fact that the fluorescein staining is not blocked by a normal tear film speaks for its great ability to diffuse into water<sup>5</sup>.

### The clinical use of fluorescein

Historically the first indication to the use of fluorescein has been the possibility of increasing visibility of small epithelial defects and assist the ophthalmologist

*L'osservazione della fluorescenza è di solito amplificata dall'uso di filtri capaci di illuminare il materiale fluorescente solo con la componente ad alta energia (filtro di eccitazione) e di osservare solo la luce fluorescente usando un'altra barriera (filtro barriera). Non è però detto che la presenza di entrambi i filtri sia indispensabile. Nella lampada a fessura utilizzata in oftalmologia, normalmente è inserito un filtro cobalto capace di eccitare la fluorescenza verde a 550 nm del colorante fluoresceina. Alcuni strumenti forniscono anche un filtro barriera da inserire lungo il ritorno dell'immagine, di solito di colore giallo.*

### La Fluoresceina

*La fluoresceina è un colorante altamente idrofilo e colora l'acqua<sup>4</sup>.*

*Teoricamente la fluoresceina non colora le cellule epiteliali normali. Il fatto che la colorabilità con fluoresceina non sia bloccata dalla presenza di un film lacrimale normale e ben funzionante conferma l'alta diffusibilità del materiale nell'acqua<sup>5</sup>.*

### L'uso Clinico della Fluoresceina

*Come abbiamo visto, storicamente la prima indicazione all'uso della fluoresceina è stata quella di mettere in luce difetti epiteliali e assistere l'oftalmologo nella*

in the diagnosis of epithelial corneal erosions and to monitor their recovery. The ability to stain the water of fluorescein showed up to be very useful: to measure the intraocular pressure by means of the optic-mechanical instruments for applanation (Goldmann type), in the study of tear film where the dye is used to measure the Break-Up Time (BUT) and in the evaluation of contact lens fitting. Fluorescein is applied to the eye by means of strips of cellulose soaked by fluorescein or by instillations into the conjunctival fornix of 1 or 2% solutions.

### **Riboflavin**

Riboflavin, vitamin B2, is a yellow-orange solid substance with poor solubility in water and rather stable at different temperatures. It is best known visually as it imparts the color to vitamin supplements and the yellow color to the urine of persons taking it (Fig. 1).

The name "Riboflavin" comes from "ribose" (the sugar whose reduced form, ribitol, forms part of its structure) and "flavin", the ring-moiety which imparts the yellow colour to the oxidized molecule (from Latin flavus, "yellow"). Riboflavin is a photosensitive vitamin and its exposure to light starts a number of chemical reactions. In aliments Riboflavin is in its phosphorylated conditions and to be adsorbed has to be de-phosphorylated by specific enzymes present in the small intestine<sup>6</sup>.

The concentration of Riboflavin in a solution can be estimated by the fluorescent strength at ultraviolet light. Day light also can be destructive for Riboflavin and Riboflavin solutions must be maintained in dark conditions. The light effect induces the detachment of ribitol and the loss of its vitamin

*diagnosi di erosioni epiteliali e nel giudicare la velocità della loro riparazione.*

*La capacità di colorare l'acqua da parte della fluoresceina si è rivelata molto utile nella misurazione del tono oculare con gli strumenti ottico meccanici di applanazione, nello studio del film lacrimale dove le proprietà del colorante vengono utilizzate per misurare il tempo di rottura del film (BUT) e nella valutazione della qualità dell'applicazione della lente a contatto.*

*La fluoresceina può essere applicata attraverso l'uso di strisce di carta bibula o cellulosa impregnate di colorante o instillata nel fornice congiuntivale in preparato in soluzione di solito allo 1 o 2%.*

### **La riboflavina**

*La riboflavina è conosciuta anche come vitamina B2 (7,8-Dimetil-10-[D-ribo-2,3,4,5-tetraidrossipentil] isoallossazina) è un composto eterociclico ottenuto da una molecola di flavina cui è legata una catena formata da ribitolo (da cui ribo). È un composto di colore giallo (dal latino flavus da cui flavina) poco solubile in acqua, stabile al calore (la cottura ne determina l'inattivazione di solo il 10-20% del quantitativo totale) (Fig. 1).*

*La riboflavina è una vitamina fotosensibile, questo vuol dire che se viene esposta alla luce inizia una sequenza di reazioni chimiche.*

*La riboflavina si trova negli alimenti principalmente come forma fosforilata. Essa, per essere assorbita, viene defosforilata da specifiche fosfatasi che si trovano nell'intestino tenue<sup>6</sup>.*

*La concentrazione di riboflavina in una soluzione può essere stimata determinando la forza della sua fluorescenza alla luce ultravioletta. In soluzione la riboflavina è stabile al calore, ma è abbastanza rapidamente distrutta dalla luce. La distruzione è più rapida con luce ultravioletta, ma la luce*



activity with the production of "lumichrom" a slightly fluorescent yellow-green compound.

In ophthalmology Riboflavin is currently and has been used for a long period of time, used by a therapeutic procedure for limiting Keratoconus progression known as "Cross-linking". Several studies have shown its absence of toxic effects on the ocular surface.

In particular Mazzotta et al<sup>7</sup> by means of confocal microscopy have shown that the cytotoxic effects of ultraviolet radiation during Cross-linking was concentrated along the 350 microns of the treated corneal stroma but did not involve the surrounding adjacent areas which had received equal quantities of Riboflavin<sup>7-8</sup>.

In an impression cytology study concerning eye drops based on Riboflavin, the authors noted an improvement of conjunctival cell conditions after one month of treatment compared to pre treatment conditions<sup>9</sup>. So, Riboflavin did not exert any cell damage and in a previous study Riboflavin seemed to play an important role in maturation and maintenance of superficial structures of epithelial cells<sup>10-11</sup>.

We thought it could be interesting to evaluate the possibility of using a Riboflavin-based eye-drop, as a fluorescent dye, for measuring intraocular pressure by means of Goldmann applanation tonometry.

## MATERIALS AND METHODS

In 20 informed and consenting patients aged 54 to 72, were randomly chosen among the patient coming to the ISPRE Ophthalmic general clinic, for intraocular pressure measurement.

In every patient after the instillation of the anaesthetic eye drop benoxinate 0.4% (Benoxinato collirio, Alfa Intes,

*del giorno è anche essa lentamente distruttiva, tanto che le soluzioni di riboflavina devono essere conservate al buio. L'effetto di luce produce il distacco di un radicale ribitolo e la conseguente perdita dell'azione vitaminica e ne risulta una sostanza, lumichrom, ancora con fluorescenza debolmente giallo-verde, ma non ha alcuna attività vitaminica.*

*La riboflavina è correntemente utilizzata in una procedura terapeutica per limitare la progressione del cheratocono conosciuta con il nome di "Cross-linking" ormai sperimentata da anni. Diversi studi hanno dimostrato l'assoluta assenza di tossicità della vitamina a livello della superficie oculare. In particolare Mazzotta et al<sup>7</sup> con la microscopia confocale hanno dimostrato che gli effetti citotossici della radiazione ultravioletta del Cross-linking erano concentrati ai soli 350 micron di stroma corneale trattato e non interessavano le strutture adiacenti che avevano ricevuto uguali quantità di riboflavina<sup>7-8</sup>. In uno studio di citologia ad impressione sull'effetto di un collirio a base di riboflavina gli autori avevano notato un miglioramento delle condizioni cellulari congiuntivali ad un mese dal trattamento rispetto alle condizioni della superficie oculare pre trattamento<sup>9</sup>.*

*La riboflavina non ha quindi prodotto alcun danno cellulare e in uno studio sperimentale precedente la riboflavina risultava giocare un ruolo importante nello sviluppo ed il mantenimento delle strutture superficiali delle cellule epiteliali<sup>10-11</sup>.*

*Ci è quindi sembrato interessante valutare la possibilità di utilizzare la riboflavina in collirio come colorante fluorescente per la routinaria misurazione del tono oculare attraverso il tonometro di Goldmann.*

## MATERIALE E METODI

*In 20 pazienti di età compresa tra i 54 ed i 72 anni, informati e consenzienti, scelti a random tra quelli afferenti all'ambulatorio*

Casoria, Naples, Italy) the very moment measurement of intraocular pressure by means of the Goldmann applanation tonometer under wood cobalt light was photographed at the slit lamp. As a staining for the tear film a 2% fluorescein eye drop was used (Fluorofta SOOFT, Montegiorgio, FM, Italy) in OD, while in the left eye a Riboflavin 3% eye drop (DROptest, Servimed, Rome, Italy) both of them available for commerce in Italy.

Exclusion criteria have been:

- any presence of disease or disturbance of the ocular surface
- patient refusal of consent to the test.

Nearly 30-60 seconds after the instillation of the preparation with the fluorescent compound at the very end of the measurement with the slit lamp a digital image of the internal contact of the two semi circles identified by the tear film entrapped inside the prism of measurement cone of the instrument was taken and saved by means of the software (Fig. 2).

The image was taken at the highest available definition at automatic gain level, using the highest light level available with the slit lamp, using the wood cobalt excitatory filter.

No blocking filter was used in the return pathway of the image.

Each image was then saved and then implemented into a software for image analysis (Image J) for OS X, open source Java scientific image processing program: a program derived from IMAGE by the NIH.

By means of this software curves of light intensity have been detected, identified by arbitrary units provided by the system emission, at the level of 3 linear segments crossing the superior arc of fluorescent light formed by the cone of the tonometer (Fig. 2).

The peak of relative brightness (0 is the

*di ISPRES Oftalmica srl per la misurazione del tono oculare, è stata fotografata alla lampada a fessura il momento della misurazione del tono oculare mediante tonometro ad applanazione di Goldmann. Dopo l'instillazione di collirio anestetico a base di Benoxinato allo 0,4%, (Benoxinato Alfa Intes, Casoria, NA) in ciascun paziente è stato utilizzato in Occhio Destro un collirio a base di fluoresceina 2% (Fluorofta SOOFT, Montegiorgio, FM) e in Occhio Sinistro un collirio a base di riboflavina 3% (DROptest Servimed, Roma) entrambi in commercio in Italia, come colorante delle lacrime.*

*Criteri di esclusione dallo studio sono stati:*

- la presenza di condizioni patologiche a carico della superficie oculare
- rifiuto del paziente a rilasciare il consenso alla misurazione.

*Al momento finale della misurazione del tono oculare 30-60" dopo l'instillazione del collirio contenente la sostanza fluorescente, è stata fotografata l'immagine alla lampada a fessura che mostra il contatto interno dei due semicerchi identificati dal fluido lacrimale sequestrato nei prismi del cono di misurazione del tonometro (Fig. 2).*

*Per la raccolta di tutte le immagini di tutti i pazienti si è utilizzato lo stesso strumento con acquisizione di immagine alla sensibilità più elevata e livello automatico del guadagno, utilizzando il massimo livello di illuminazione della lampada a fessura attraverso il filtro eccitatorio cobalto di Wood. Nessun filtro barriera è stato inserito nella via di raccolta dell'immagine. Ogni immagine ottenuta è stata implementata nel software di analisi dell'immagine Image J for OS X (open source Java scientific image processing program derivato dal programma IMAGE di NIH) attraverso questo sono state valutate le curve di intensità della luce, identificate in unità arbitrarie fornite dal sistema di valutazione, a livello dei*



Fig. 2

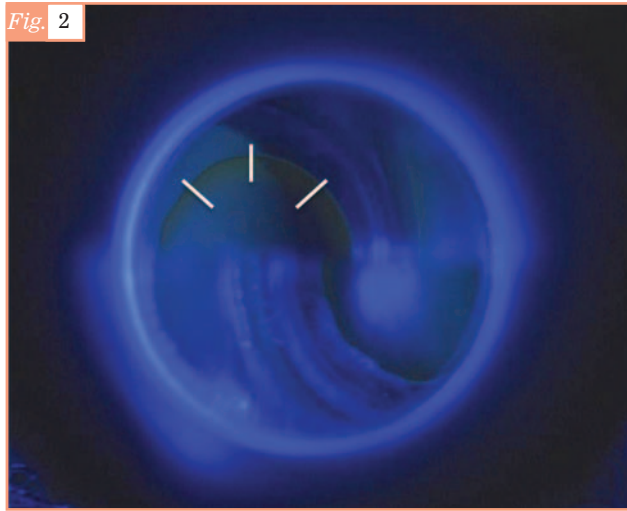


Fig. 2

Applanation tonometry according to Goldmann. Staining of the lacrimal fluid by riboflavin. The recognition of the tear rings is not sharp because of tear film irregularity. The lines indicate the locations of measurement of the levels of fluorescence. The highest value of fluorescence has been considered a good indicator of the evidence of the signal and has been used for the study.

*Tonometria ad appianazione secondo Goldmann.*

*Colorazione del fluido lacrimale con riboflavina.*

*L'individuazione degli anelli di lacrime è imprecisa a causa dell'irregolarità del film lacrimale. Le linee individuano le zone di rilevamento delle curve del livello di fluorescenza.*

*Il massimo livello di fluorescenza ottenuto è stato ritenuto un buon indicatore della "visibilità" del segnale ed utilizzato per lo studio.*

lowest level of brightness of the image) of the superior semicircle formed by the fluorescent tears collected by the prisms of the testing cone has been analysed on axes 45° - 90° - 135°.

The averages of the level of fluorescence given by each of the three measurements in one eye have been compared with the ones obtained from the contralateral eye.

Since the thickness of each semicircle is dependent on the amount of tears available in that very moment and cannot be the same in all the subjects, to reduce this bias of variability among results, in the same and among different patients, we evaluated only the peak of fluorescence in the single segment of semicircle under analysis (Fig. 3-4-5-6).

## RESULTS

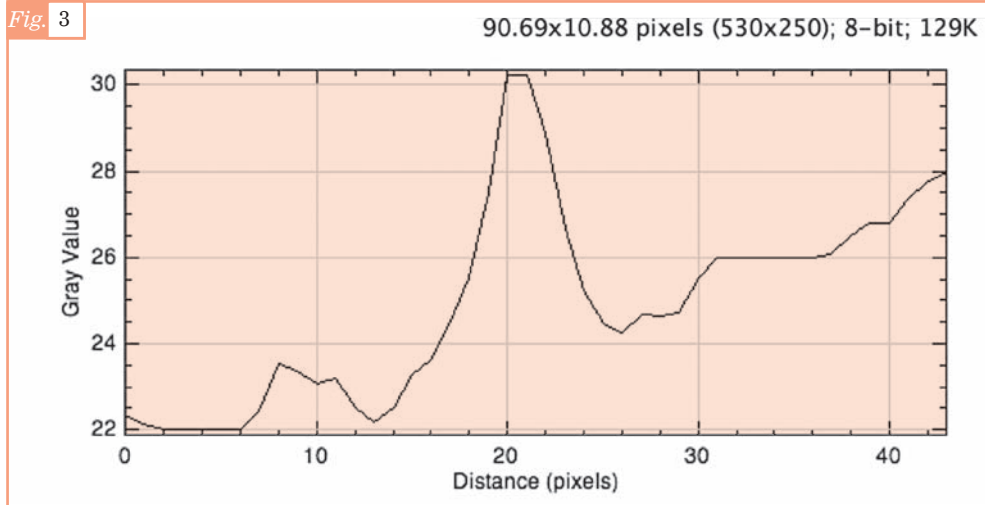
The table 1 shows the relative levels of brightness/fluorescence (OD (RE)= Fluoresceine, OS (LE) riboflavine) measured at 45-90-135° at the level of the superior ring of fluorescent tears identified by the applanation system of the tonometer at the very moment of measurement of Intra-Ocular Pressure. The average of light intensity peaks obtained in each of the 3

segmenti lineari che attraversavano l'arco superiore identificato dal tonometro (Fig. 2). L'entità del picco della luminosità relativa (mettendo 0 il valore di luminosità minimo dell'immagine selezionata) del semicerchio superiore formato sulla superficie oculare dalla raccolta di lacrime da parte dei prismi di misurazione è stata ritenuta il livello massimo di fluorescenza ed è stata analizzata sugli assi 45°, 90°, 135°. Le medie dei livelli di fluorescenza ottenuti per ciascuna delle 3 misurazioni in un occhio sono stati confrontati con quelli ottenuti sull'occhio controlaterale. Dal momento che lo spessore del semicerchio risente del volume lacrimale disponibile sulla superficie oculare, non può essere uguale in tutti i soggetti misurati, per limitare la variabilità dei risultati nello stesso paziente e tra differenti pazienti si è valutato esclusivamente il picco di fluorescenza ottenuto nel singolo segmento di semicerchio analizzato (Fig. 3-4-5-6).

## RISULTATI

La tabella 1 mostra i livelli relativi di fluorescenza (OD FLUORESCEINA OS RIBOFLAVINA) misurati a 45, 90, 135° a livello degli anelli di lacrime identificati dal sistema di appianazione al momento della misurazione del valore del tono



**Fig. 3**

Profile of the light intensity of the linear image collected during intraocular pressure measurement at the level of the fluorescent arc provided by the cone of the applanating tonometer (left eye after Riboflavin eye drops instillation). The light intensity peak, indicating the maximum level of fluorescence is just above the 30 arbitrary units.

*Profilo della luminosità dell'immagine lineare raccolta al momento della misurazione del tono oculare a livello dell'arco fluorescente determinato a livello della superficie corneale dal cono del tonometro ad applanazione (occhio sinistro dopo instillazione del collirio alla riboflavina. Il picco di luminosità che corrisponde al massimo della fluorescenza supera di poco le 30 unità arbitrarie).*

measurements in every eye were 35,561 +/- 3,273 (SD) in right eye (fluorescein eye drops) and 35,131 +/- 2,902 (SD) in the left eye (Riboflavin eye drops).

Two tails "t" test was not able to find any difference between the light intensities averages of the two groups. ( $p=0,662674$ ), rejecting in this way a difference in behaviour of the two preparations in stimulating fluorescence of the tear film fluid at Wood blue light during intra ocular measurement with Goldmann's applanation tonometer. No patient showed signs or symptoms of discomfort or complained of adverse reactions at the instillation of both types of eye drops.

## DISCUSSION

The reduced availability of fluorescein raised a further difficulty in performing a complete ophthalmologic exam. Therefore is useful to try to find alternative dyes. Intraocular pressure measurement by means of Goldman instrument is a routinary activity in every ophthalmologic clinical practice.

It should be performable with sure and efficient procedures without loss of the already scarcely available time.

oculare. La media dei picchi di intensità luminose ottenute per ciascuna delle 3 misurazioni effettuate lungo le 3 porzioni di immagine identificate in ciascun occhio erano rispettivamente 35,561 +/- 3,273 (SD) negli occhi Destri (collirio alla fluoresceina) e 35,131 +/- 2,902 (SD) negli occhi sinistri (collirio a base di riboflavina).

L'analisi con il test "t" di Student a 2 vie non ha mostrato differenze significative tra le medie delle intensità luminose dei due gruppi ( $p=0,662674$ ) negando quindi una differenza di comportamento dei due preparati nello stimolare la fluorescenza del fluido lacrimale alla luce di Wood nella misurazione della pressione oculare. Nessun paziente ha avuto segni di discomfort o lamentato reazioni avverse all'instillazione di entrambi i tipi di colliri.

## DISCUSSIONE

La scarsa disponibilità della fluoresceina ha creato un'aggiuntiva difficoltà nell'eseguire la visita oftalmologica completa. È quindi utile cercare preparazioni alternative.

La misurazione del tono oculare con lo strumento di Goldmann è un'attività routinaria per l'oftalmologo in qualsiasi pratica clinica. Deve quindi essere



Fig. 4

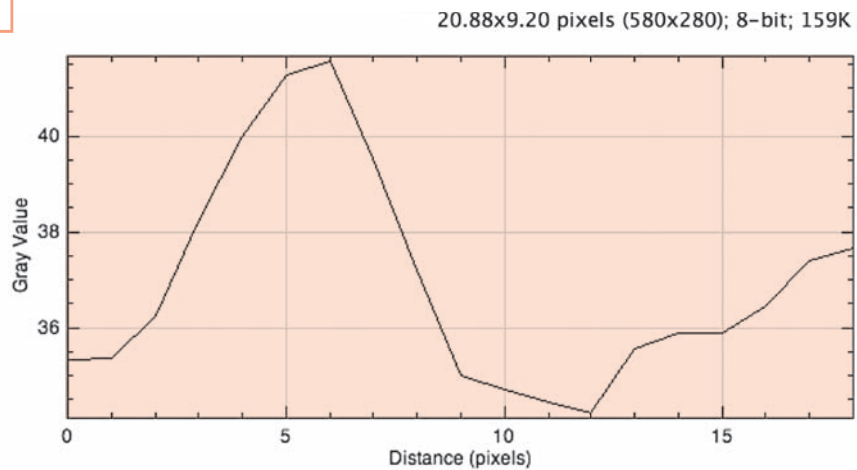


Fig. 4

Profile of the light intensity of the linear image collected during intraocular pressure measurement at the level of the fluorescent arc provided by the cone of the applanating tonometer (right eye after fluorescein eye drops instillation). The light intensity peak, indicating the maximum level of fluorescence is just above the 40 arbitrary units).

*Profilo della luminosità dell'immagine lineare raccolta al momento della misurazione del tono oculare a livello dell'arco fluorescente determinato a livello della superficie corneale dal cono del tonometro ad applanazione (occhio destro dopo instillazione del collirio alla fluoresceina. Il picco di luminosità che corrisponde al massimo della fluorescenza supera le 40 unità arbitrarie).*

In measuring Intraocular pressure by means of Goldmann applanation tonometer, is mandatory that the emirings of lacrimal fluid entrapped inside the prisms during the applanation process performed by the measuring cone over the ocular surface are easily visible.

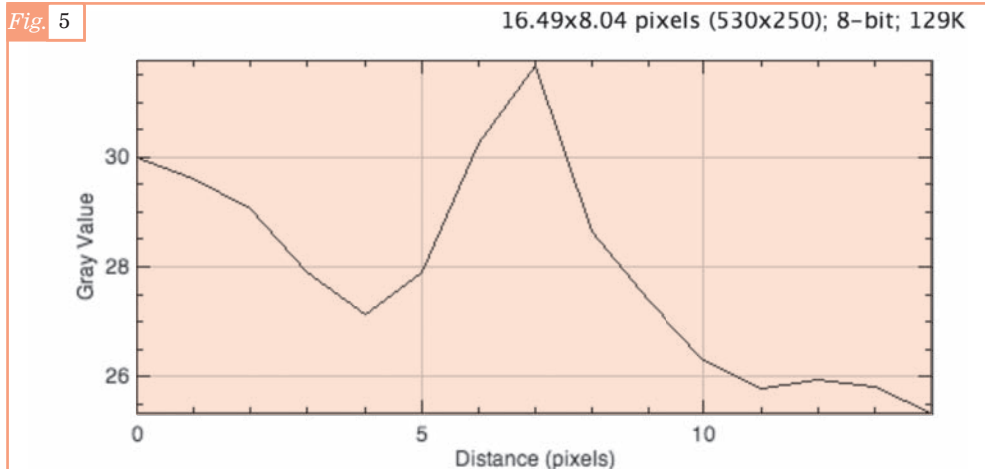
Because of its outstanding tolerability and the multi annual experience available in ophthalmology in Cross-linking treatment of Keratoconus, a Riboflavin based eye drop formulation represents an interesting alternative to fluorescein for clinical tonometry. Our study shows how there is not a significant difference in visibility of the fluorescent signal, between fluorescein and Riboflavin eye drops during Goldmann's applanation tonometry.

A possible source of bias could be the fact that the instillation of the eye drops in the right eye could have stimulated, in spite of the topic anaesthetic, a reflex tear secretion in the left eye so diluting the amount of Riboflavin in front of the ocular surface. This in part could be an explanation of the impression of lower (not statistically significant) fluorescence of the left eyes.

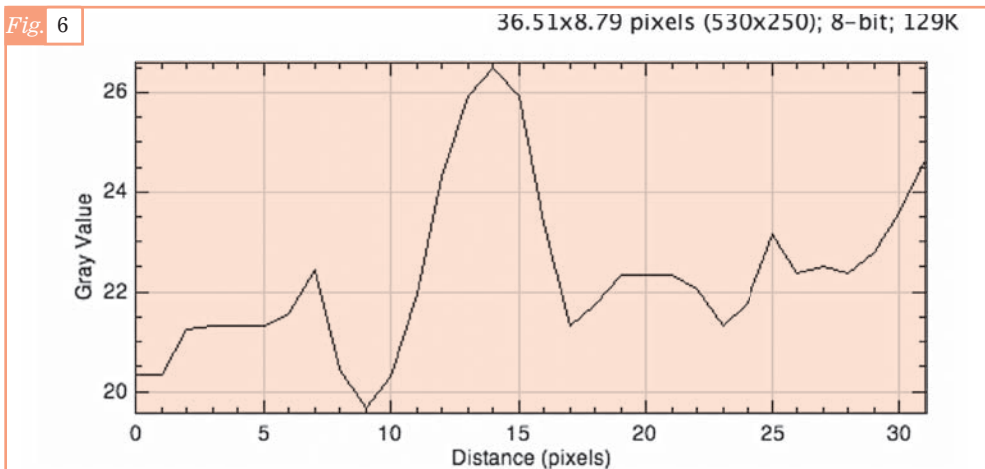
*facilmente eseguibile con procedure sicure ed efficaci che non comportino spese di tempo, spesso già scarsamente disponibile. L'interesse nella misurazione del tono oculare mediante lo strumento ad applanazione di Goldmann è che gli anelli di fluido lacrimale sequestrati dai prismi mediante il processo di applanazione prodotto dal cono sulla superficie oculare siano facilmente individuabili. Per la sua ottima tollerabilità e per l'esperienza pluriennale del preparato in oftalmologia, nel trattamento del Cross-linking per Cheratocono, un collirio a base di riboflavina si presenta come una possibile interessante alternativa all'uso della fluoresceina nella tonometria.*

*Il nostro studio dimostra come non vi sia, nel processo di misurazione del tono oculare mediante il sistema ad applanazione di Goldmann, una differenza significativa nella visibilità del segnale fluorescente tra colliri con fluoresceina e colliri con riboflavina.*

*Una possibile sorgente di bias tuttavia potrebbe nascere dal fatto che l'instillazione del collirio nell'occhio destro possa, malgrado l'anestesia della superficie oculare, aver stimolato una secrezione riflessa e quindi una diluizione a livello della superficie pre-corneale del contenuto di riboflavina. Questo potrebbe*

**Fig. 5**

Profile of the light intensity of the linear image collected during intraocular pressure measurement at the level of the fluorescent arc provided by the cone of the applanating tonometer (left eye after Riboflavin eye drops instillation). The light intensity peak, indicating the maximum level of fluorescence is above the 30 arbitrary units).

**Fig. 6**

Profile of the light intensity of the linear image collected during intraocular pressure measurement at the level of the fluorescent arc provided by the cone of the applanating tonometer (right eye after fluorescein eye drops instillation). The light intensity peak, indicating the maximum level of fluorescence is just above the 26 arbitrary units).

Personal experience suggests using Riboflavin in eye drops form instead of impregnated sticks, because the best fluorescence requires adequate amounts of Riboflavin containing fluid on the ocular surface (unpublished data).

## CONCLUSIONS

On the strength of the fluorescence characteristics shown in this study, the DROPtest formulation of Riboflavin appears to be an appropriate substitute for fluorescein solutions in measuring Intra Ocular Pressure by means of the Goldmann applanation tonometer, since it shows fluorescence characteristics under Wood light comparable to fluorescein containing eye drops.

*giustificare in parte l'impressione di una minore fluorescenza del preparato data dai numeri ma non dalla valutazione statistica. Esperienze personali suggeriscono che il preparato sia utilizzato sotto forma di collirio, piuttosto che sotto forma di stick o cartina, in quanto, l'ottimale fluorescenza richiede quantità di fluido con riboflavina adeguate e una scarsità di fluido sulla superficie oculare può essere causa di riduzione della visibilità della fluorescenza del composto in particolare se si valutano occhi relativamente secchi con strumenti con modesta capacità illuminante (dati non pubblicati).*

## CONCLUSIONI

*Per le caratteristiche di fluorescenza dimostrate nello studio, la formulazione a*

*Profilo della luminosità dell'immagine lineare raccolta al momento della misurazione del tono oculare a livello dell'arco fluorescente determinato a livello della superficie corneale dal cono del tonometro ad applanazione (occhio destro dopo instillazione del collirio alla fluoresceina. Il picco di luminosità che corrisponde al massimo della fluorescenza supera le 26 unità arbitrarie).*



Tab. RESULTS

1

n° paziente	(RE) o destro 45°	o (RE) destro 90°	o (RE) destro 135°	MEDIE 3 MISURE	(LE) o sinistro 45°	(LE) o sinistro 90°	(LE) o sinistro 135°	MEDIE 3 MISURE
1	31,7	32	33	32,23333	26,4	27	30	27,8
2	41	40	38	39,66666	39	32	29	33,33333
3	45	44	40	43	36	33	33	34
4	36	38	37	37	36	39	38	37,66666
5	37	36	35	36	31	33	33	32,33333
6	29	32	34	31,66666	33	40	34	35,66666
7	32	31	34	32,33333	35	33	35	34,33333
8	46	43	43	44	41	32	41	38
9	39	40	38	39	32	29	42	34,33333
10	34	33	36	34,33333	38	37	38	37,66666
11	37	36	35	36	39	37	36	37,33333
12	35	37	35	35,66666	35	33	33	33,66666
13	29	31	33	31	36	39	29	34,66666
14	31	31	32	31,33333	33	29	33	31,66667
15	39	37	35	37	39	31	37	35,66666
16	35,7	36	33	34,9	36	39	35	36,66666
17	34,6	34	36	34,86666	31	33	32	32
18	29,7	32	34	31,9	37,5	39	35	37,16666
19	38	37	36	37	38	40	39	39
20	33	33	31	32,33333	37	44	38	39,66666

**Tab. 1**  
Relative brightness values in images taken in patients who received fluorescein eyedrops (right eye: OD) and those who received Riboflavine solution (Left eye: OS).

Valori di luminosità relativa dell'immagine nei pazienti che avevano ricevuto una goccia di fluoresceina (occhio destro) e quelli che avevano ricevuto una goccia di riboflavina (occhio sinistro).

base di riboflavina DROptest appare un sostituto appropriato della fluoresceina, nella misurazione del tono oculare con lo strumento ad appianazione di Goldmann, con caratteristiche di fluorescenza, alla stimolazione con la luce di Wood, a livello del film lacrimale, paragonabili a quelle ottenute dalle tradizionali instillazioni di preparati a base di fluoresceina.

## REFERENCES

- Bright DC, Potter JW, Allen DC, Spruance RD. Goldmann applanation tonometry without fluorescein. *Am J Optom Physiol Opt* 1981 Dec;58(12):1120-26
- Guillon M. *Basic contact lens fitting*. In Rubin M and Guillon M (eds). *Contact Lens Practice* (Chapman and Hall Medical) 1994;587-622
- Peter Atkins, Julio De Paula, *Chimica Fisica*, 4<sup>a</sup> ed., Bologna, Zanichelli, settembre 2004, ISBN 88-08-09649-1
- Gelatt KN, editor. *Veterinary Ophthalmology*. Ames, Iowa: Blackwell Publishing; 1978:165-1274.
- Feenstra RP, Tseng SC. *Comparison of fluorescein and rose bengal staining*. *Ophthalmology* 1992;99:605-17
- Bruno EJ Jr, Ziegenfuss TN. *Water-soluble vitamins: research update*. *Curr Sports Med Rep* 2005 Aug;4(4):207-13. Review
- Mazzotta C, Balestrazzi A, Traversi C, Baiocchi S, Caporossi T, Tommasi C, et al. *Treatment of progressive keratoconus by riboflavin-UVA-induced cross-linking of corneal collagen: ultrastructural analysis by Heidelberg Retinal Tomography II in vivo confocal microscopy in humans*. *Cornea* 2007;26(4):390-97
- Spoerl E, Mrochen M, Sliney D, Trokel S, Seiler T. *Safety of UVA-riboflavin cross-linking of the cornea*. *Cornea* 2007;26(4):385-89. Comment in: *J Refract Surg*. 2012;28(2):91-2
- Renesto Ada C, Barros Jde N, Campos M. *Impression cytologic analysis after corneal cross-linking and insertion of corneal ring segments for keratoconus: two-year results*. *Arq Bras Oftalmol* 2012 Mar-Apr;75(2):101-6
- Wollensak G, Spoerl E, Reber F, Seiler T. *Keratocyte cytotoxicity of riboflavin/UVA-treatment in vitro*. *Eye (Lond)* 2004;18(7):718-22.
- Takami Y, Gong H, Amemiya T. *Riboflavin deficiency induces ocular surface damage*. *Ophthalmic Res*. 2004;36(5):156-65. Erratum in: *Ophthalmic Res*. 2004;36(5):299-302