

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 322**

51 Int. Cl.:

G01N 1/31 (2006.01)

G01N 1/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.03.2013 PCT/IT2013/000088**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013 WO13144986**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2013 E 13722583 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.06.2018 EP 2831560**

54 Título: **Composición, uso de la composición y método para el procesamiento de muestras histológicas y citológicas, post mortem**

30 Prioridad:

30.03.2012 IT CA20120004
21.11.2012 IT RM20120583

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.10.2018

73 Titular/es:

MADAU, GIACOMO (33.3%)
Via Tigellio 24
09123 Cagliari (CA), IT;
HARCHI, ABDELKRIM (33.3%) y
ROLESU, GIORGIO (33.3%)

72 Inventor/es:

MADAU, GIACOMO;
HARCHI, ABDELKRIM y
ROLESU, GIORGIO

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 688 322 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

Composición, uso de la composición y método para el procesamiento de muestras histológicas y citológicas, post mortem

5 La presente invención se refiere a una composición para el procesamiento de muestras histológicas, post mortem, citológicas. En particular, la invención se refiere a una composición para el procesamiento de muestras histológicas, post mortem, citológicas o muestras similares, no siendo dicha composición dañina ni tóxica y pudiendo producir tanto la deshidratación como diafanización de las muestras biológicas en poco tiempo.

10 Los procedimientos preanalíticos usados en anatomía patológica proporcionan una etapa de tratamiento de las muestras biológicas (o etapa de procesamiento), previamente fijadas en formalina, que consisten, por ejemplo, en tejidos o células recogidos por un paciente o post mortem, que permiten solidificar la muestra y cortarla en secciones que se van a analizar.

La fase de procesamiento de las muestras biológicas en general comprende las siguientes etapas: a) etapa de fijación; b) etapa de deshidratación; c) etapa de diafanización; d) etapa de inclusión.

15 En la etapa de fijación, partes anatómicas que se obtienen, por ejemplo, de quirófanos o salas de autopsia, se sumergen en un fluido de fijación, en general formalina al 10% tamponada o alcohol u otros fijadores específicos dependiendo de la peculiaridad de los posteriores análisis histológicos o inmunohistoquímicos. La función de esta etapa es detener la desnaturalización de proteínas previniendo el desprendimiento de cadenas de proteínas. Por lo tanto, la fijación tiene el fin de mantener la estructura del tejido.

20 La etapa de deshidratación consiste en eliminar agua (la formalina es una disolución acuosa de formaldehído) de la muestra biológica y después incluirla en parafina, siendo esta última insoluble en agua. Esta etapa se lleva a cabo sumergiendo la muestra en disolvente anhidro soluble en agua.

25 La etapa de diafanización permite incluir la muestra biológica en parafina en lo sucesivo. Para este fin, se usan disolventes compatibles con el agente de impregnación (por ejemplo parafina), que en esta etapa sustituye al disolvente soluble en agua. Por ejemplo, los agentes de diafanización son disolventes parafínicos, xileno o sustitutos de xileno tales como D-limoneno, isoparafinas, octano, acetona.

30 Finalmente, la muestra se somete a la etapa de inclusión en parafina que consiste en sumergir la muestra en parafina fundida a aproximadamente 54-58°C. En esta etapa, el disolvente de diafanización contenido en tejidos se sustituye por parafina. Después de haber incluido las muestras en una platina, se lleva a cabo el enfriamiento y solidificación, que permitirán llevar a cabo el corte de las secciones con microtomo en el tamaño micrométrico deseado para la observación con el microscopio.

35 Actualmente el procesamiento de muestras se lleva a cabo automáticamente mediante dispositivos que permiten programar el tiempo de permanencia, temperatura, presión y vacío en cada reactivo. En general las estaciones son 12 o 15 y el tiempo medio de toda la etapa de procesamiento es 12-18 horas. El tiempo depende del tipo de tejido. Mediante el método estándar convencional, el procesamiento se lleva a cabo por etapas en alcohol etílico que tienen una graduación creciente con el fin de deshidratar el tejido biológico. Las etapas se llevan a cabo antes en alcohol etílico al 50%, y después, en una etapa posterior, en alcohol etílico al 70%, más tarde alcohol etílico al 80%, después alcohol etílico al 90%, más tarde se llevan a cabo tres etapas en alcohol al 96% y tres etapas en alcohol absoluto anhidro al 99,99%. Al final de esta etapa toda el agua del tejido de la muestra se ha sustituido con alcohol etílico.

40 Las etapas posteriores corresponden a la etapa de diafanización que tiene el fin de sustituir el alcohol por un disolvente compatible con la parafina. En general, en esta etapa se usa xilol o un sustituto del mismo y se llevan a cabo 3 etapas en 3 estaciones diferentes, porque es necesario que el tejido pase a otra estación con disolvente limpio después de haber liberado alcohol en la primera etapa.

Finalmente, en la etapa de inclusión el tejido se procesa en 3 o 4 estaciones de parafina fundida a 54-58°C.

45 En resumen, el estado de la técnica, después de fijación en formalina al 10%, proporciona las siguientes etapas y tiempos:

1,00 hora en alcohol al 50%

1,00 hora en alcohol al 70%

1,00 hora en alcohol al 80%

50 1,00 hora en alcohol al 96%

1,00 hora en alcohol al 96%

1,30 horas en alcohol al 99,99%

1,30 horas en alcohol al 99,99%

1,00 hora en xilol o sustituto

1,00 hora en xilol o sustituto

5 1,30 horas en xilol o sustituto

1,30 horas en parafina

2,00 horas en parafina

2,00 horas en parafina

10 Basándose en lo descrito antes, es evidente que los métodos conocidos presentan varias desventajas: se proporciona el uso de diferentes reactivos, lo que hace necesaria la preparación de graduaciones crecientes de alcohol, xilol o sus sustitutos; el uso de disolventes muy volátiles (alcohol o xilol); el uso de sustancias que producen alergias, tales como xilol, toluol, octano, d-limoneno, trementina, acetona, isoparafinas, o que son dañinas y en algunos casos tóxicas para los operarios, por ejemplo, el xilol, toluol, octano, acetona, isoparafinas; tiempos largos y numerosas estaciones para el procesamiento.

15 Se conocen otros métodos de procesamiento que usan una mezcla de alcohol etílico, alcohol isopropílico e hidrocarburos derivados de petróleo crudo, por ejemplo octano o isoparafinas en lugar de alcohol y xilol o un sustituto de xilol. En particular, las patentes EP0822403 y EP1508026 describen un método para el procesamiento de tejido basado en el uso de una mezcla que permite llevar a cabo la deshidratación y diafanización de muestras al mismo tiempo. Dicha mezcla está constituida por octano (o isoparafinas), alcohol isopropílico y etanol. Sin embargo, incluso aunque estos métodos reducen los tiempos de procesamiento de las muestras, presentan las importantes desventajas de uso de sustancias, tales como octano o isoparafinas, que tienen alta volatilidad y nocividad para los operarios y el medio ambiente.

20 A la luz de lo anterior, es por lo tanto evidente la necesidad de proporcionar nuevos reactivos capaces de superar las desventajas de los reactivos conocidos.

25 Los autores de la presente invención han encontrado que ésteres de 2-etilhexilo seleccionados del grupo que consiste en benzoato de 2-etilhexilo, palmitato de 2-etilhexilo, cocoato de 2-etilhexilo, estearato de 2-etilhexilo, acetato de 2-etilhexilo, preferiblemente benzoato de 2-etilhexilo, tienen capacidad de diafanización. Por lo tanto, los autores de la invención han preparado una composición deshidratante y diafanizante para procesar muestras biológicas que se van a someter a análisis, no teniendo dicha composición hidrocarburos aromáticos policíclicos carcinógenos para seres humanos. La composición según la presente invención, a diferencia de los reactivos conocidos, no es ni nociva ni tóxica para los operarios, de acuerdo con la directiva europea sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos derivados de la exposición a agentes químicos, físicos y biológicos durante el trabajo, y relacionada con la mejora de la seguridad y salud de los trabajadores. Además, la composición de la presente invención presenta baja volatilidad, siempre de acuerdo con las directivas europeas sobre seguridad en el sitio de trabajo y alta biodegradabilidad (aproximadamente 88%) para un mayor respecto al medio ambiente.

35 El uso de la composición según la presente invención permite reducir notablemente los tiempos de procesamiento de las muestras y simplificar las etapas del procesamiento. La composición según la invención sustituye, de hecho, reactivos conocidos de las etapas de deshidratación y diafanización. Por lo tanto, directamente o después de fijación en formalina al 10%, la muestra se procesa con la composición de la invención, como reactivo único, evitando las diferentes fases de deshidratación en alcohol etílico y diafanización en xilol y sus sustitutos. Además, según el método de la presente invención, se reducen las estaciones de diafanización a tres con un tiempo medio de permanencia en el reactivo de 1,30 horas. Más precisamente, el procesamiento del tejido, después de fijación, comprende tres etapas del tejido en el mismo reactivo en tres estaciones diferentes, y después el paso a la fase de inclusión en parafina, durante 1,30 horas cada uno.

45 Por lo tanto, el tiempo de procesamiento con respecto a la técnica anterior se reduce a aproximadamente 9 horas para el procesamiento complejo, con respecto a las 15 o 18 horas del procesamiento convencional. Se describe a continuación un ejemplo de procesamiento según la presente invención aplicado a un tejido con alto porcentaje de sustancia lipídica (por lo tanto crítico) y con un espesor de 4 mm. Los tejidos con porcentajes bajos de sustancia lipídica y con un espesor más fino conducen a una reducción notable del tiempo y estaciones de procesamiento.

50 El procesamiento usando la composición de la invención, después de la fijación, puede comprender las siguientes estaciones y tiempos:

1,30 horas en reactivo objeto de la invención;

1,30 horas en reactivo objeto de la invención;

1,30 horas en reactivo objeto de la invención;
 1,30 horas en parafina;
 1,30 horas en parafina;
 1,30 horas en parafina.

5 Como una alternativa, para biopsias pequeñas el método puede comprender:

5 minutos en reactivo objeto de la invención;
 5 minutos en reactivo objeto de la invención;
 5 minutos en reactivo objeto de la invención;
 5 minutos en reactivo objeto de la invención;

10 5 minutos en parafina;
 5 minutos en parafina.

En los ensayos experimentales en los que se usó el procesamiento de la muestra biológica usando la composición según la presente invención, se observó una mejora de la estructura celular del tejido, en concreto una conservación de la morfología y coloración del compuesto de diagnóstico. Por esta razón, debe destacarse el hecho de que se llevaron a cabo numerosos ensayos comparativos, en concreto cada muestra se dividió en muchas partes y una parte de la muestra se sometió a un procesamiento según el método tradicional, mientras que otra parte se sometió a un procesamiento con la composición objeto de la presente invención. Comparando los resultados obtenidos, tanto por el método tradicional como por la composición objeto de la presente invención, se demostró el resultado de que la muestra procesada con la composición objeto de la presente invención, después de corte y coloración, aparece más clara y mejor diferenciada en un microscopio. La estructura celular aparece más definida, permitiendo por lo tanto una lectura e interpretación del diagnóstico más fáciles. Se llevaron a cabo ensayos inmunohistoquímicos adicionales, comparados usando los mismos tiempos de tratamiento (el mismo tiempo de recuperación del antígeno, incubación de anticuerpo, sistema de detección y cromogénico). En lo que se refiere a la positividad o negatividad de la reacción de antígeno-anticuerpo, los resultados se solapaban, además, las muestras procesadas con la composición objeto de la presente invención, presentaban una definición cromogénica mejor en los sitios positivos para antígeno-anticuerpo en la etapa del microscopio. Por lo tanto, el procesamiento según la presente invención hace que el diagnóstico sea más fiable, en especial en casos en los que es necesario llevar a cabo un análisis cuantitativo sobre la positividad de la superficie del tejido.

Por lo tanto un objeto específico de la presente invención es el uso de una composición que comprende o consiste en: a) al menos un éster de 2-etilhexilo seleccionado del grupo que consiste en benzoato de 2-etilhexilo, palmitato de 2-etilhexilo, cocoato de 2-etilhexilo, estearato de 2-etilhexilo, acetato de 2-etilhexilo; b) alcohol que consiste en alcohol etílico y/o alcohol isopropílico, para deshidratar y diafanizar las muestras biológicas en un procesamiento de muestras biológicas, por ejemplo muestras histológicas, citológicas, post mortem o similares. Dichas muestras, después de procesamiento según la presente invención se pueden someter a análisis en microscopio, análisis inmunohistoquímico, análisis basado en las técnicas de biología molecular ISH, FISH, CISH, PCR.

Preferiblemente, se usa una mezcla de alcohol etílico con un porcentaje bajo de alcohol isopropílico, porque el alcohol isopropílico se considera irritante y es muy volátil, por lo tanto es mejor usarlo poco. Sin embargo, la muestra se puede procesar incluso con una composición que contiene solo alcohol etílico y éster de 2-etilhexilo, preferiblemente benzoato de 2-etilhexilo, o solo alcohol isopropílico y éster de 2-etilhexilo, preferiblemente benzoato de 2-etilhexilo.

En la composición según la presente invención, preferiblemente la concentración del éster de 2-etilhexilo, preferiblemente benzoato de 2-etilhexilo, está en el intervalo de 30 a 70%, la concentración de alcohol etílico está en el intervalo de 20 a 60% y la concentración de alcohol isopropílico está en el intervalo de 10 a 30%, en las que dichos porcentajes son porcentajes en volumen con respecto al volumen total de la composición. Según una realización preferida la concentración de éster de 2-etilhexilo, preferiblemente benzoato de 2-etilhexilo, es 50%, la concentración de alcohol es 35% de alcohol etílico y 15% de alcohol isopropílico, en donde dichos porcentajes son porcentajes en volumen con respecto al volumen total de la composición.

Alternativamente, el éster de 2-etilhexilo se puede sustituir por una mezcla de glutarato de diisobutilo o dimetilo en una concentración de 55 a 70%, adipato de diisobutilo o dimetilo en una concentración de 10 a 30% y succinato de diisobutilo o dimetilo en una concentración de 10 a 25%, en donde dichos porcentajes son porcentajes en volumen con respecto al volumen total de la mezcla de glutarato, adipato y succinato de diisobutilo o dimetilo.

Un objeto adicional de la presente invención es una composición que comprende o consiste en: a) al menos un éster de 2-etilhexilo seleccionado del grupo que consiste en benzoato de 2-etilhexilo, palmitato de 2-etilhexilo, cocoato de

2-etilhexilo, estearato de 2-etilhexilo, acetato de 2-etilhexilo; b) alcohol que consiste en alcohol etílico y/o alcohol isopropílico, en donde la concentración de éster de 2-etilhexilo es 50%, la concentración de alcohol es 35% de alcohol etílico y 15% de alcohol isopropílico, en donde dichos porcentajes son porcentajes en volumen con respecto al volumen total de la composición.

- 5 La presente invención se refiere además a un método para procesar muestras biológicas, que comprende o consiste en la etapa de deshidratar y diafanizar una muestra biológica, tal como muestras histológicas, citológicas, post mortem o similares, con la composición como se ha descrito antes. Según el método de la invención, el tratamiento de la muestra puede ocurrir a una temperatura que está en el intervalo de 20-30°C a 80°C o a temperatura ambiente.

- 10 Un objeto adicional de la presente invención, es el uso de al menos un éster de 2-etilhexilo seleccionado del grupo que consiste en benzoato de 2-etilhexilo, palmitato de 2-etilhexilo, cocoato de 2-etilhexilo, estearato de 2-etilhexilo, acetato de 2-etilhexilo benzoato de 2-etilhexilo, preferiblemente benzoato de 2-etilhexilo, como agente de diafanización en muestras biológicas.

La presente invención se describirá ahora mediante una forma ilustrativa pero no limitante según sus realizaciones preferidas.

- 15 Ejemplo 1: Procesamiento de biopsias pequeñas (pulmonar, renal, hepática) de aproximadamente 1 mm de espesor y 1 cm de largo.

- 20 La toma de biopsia recién realizada (guiada por TAC, por medio endoscópico o percutáneo) se sumerge inmediatamente en la composición de la presente invención (mezcla alcohólica al 50% + benzoato de 2-etilhexilo al 50%) durante 1 hora (durante 30 minutos si la muestra ya está fijada en formalina). El procesamiento completo comprende: 30 minutos de fijación, 3 etapas de aproximadamente 7 minutos cada una en la composición objeto de la invención, 2 etapas de aproximadamente 5 minutos cada una en parafina fundida a 58°C. Después la muestra se incluye en parafina y se corta mediante microtomo. Las secciones obtenidas se ponen en una estufa a 60°C durante aproximadamente 20 minutos. Más tarde, se lleva a cabo una coloración preliminar con hematoxilina y eosina (la etapa de coloración que comprendía el montaje del portaobjetos, tiene una duración estándar de aproximadamente 1 hora). Después el portaobjetos se examina con un microscopio.

Conclusiones: desde el momento de la toma de la biopsia hasta el momento de la formulación del diagnóstico (incluso si era preliminar, pero en cualquier caso morfológico) solo son necesarias tres horas, en el caso de biopsias no "fijadas"; aproximadamente dos horas y media en el caso de biopsias que han llegado al laboratorio ya "fijadas en formalina al 10%".

- 30 Una parte de las mismas muestras biológicas se sometieron a un procesamiento con soluciones que contenían alcohol isopropílico, alcohol etílico y octano, o como una alternativa, isoparafinas. Las muestras procesadas con la composición objeto de la invención mostraban una mayor estructura desde el punto de vista morfológico y rendimiento cromático, después de la coloración histoquímica en hematoxilina-eosina. Por lo tanto, se podía observar una mayor definición de detalles de la estructura celular. Además, los ensayos inmunoquímicos mostraban que los resultados se solapaban en relación con la positividad y negatividad de la reacción antígeno-anticuerpo.

Además, las muestras procesadas con la composición objeto de la invención, en la etapa del microscopio, tenían una mejor definición en los sitios positivos para antígeno-anticuerpo. Por lo tanto, el procesamiento según la presente invención hace el diagnóstico más fiable, en especial en aquellos casos en los que, para fines de diagnóstico, es necesario llevar a cabo un análisis cuantitativo sobre la positividad de la superficie del tejido.

- 40 Ejemplo 2: Procesamiento de un tejido pulmonar recogido, compuesto de aproximadamente 50% en volumen de tejido aparentemente normal y por tejido aparentemente no normal para el 50%, en concreto patológico (posible tumor) que tenía forma de paralelepípedo de 1 cm x 1 cm x 0,5 cm de tamaño.

- 45 La muestra de tejido recién recogida en el quirófano se reduce a los tamaños citados antes y se sumerge durante 3 horas en la composición de la invención (mezcla alcohólica al 50% + benzoato de 2-etilhexilo), en 3 etapas de aproximadamente 60 minutos.

Después la muestra se sumerge en parafina durante aproximadamente 1 hora (2 etapas de 30 minutos cada una), se corta mediante microtomo, se pone en la estufa durante aproximadamente 20 minutos y se colorea con hematoxilina y eosina (duración de la coloración aproximadamente 1 hora).

- 50 Conclusiones: desde la toma de muestra en el quirófano al momento de la formulación del diagnóstico se necesitan aproximadamente 6 horas, teniendo en cuenta incluso los tiempos medios para el transporte de materiales desde el quirófano a los laboratorios.

- 55 Como en el caso previo, se procesaron las muestras incluso con soluciones que contenían alcohol isopropílico, alcohol etílico y octano o como una alternativa isoparafinas. Se consideró que los resultados con las muestras procesadas con la composición objeto de la invención se solapaban con respecto a los resultados obtenidos tanto con la composición que contenía octano como con la composición que contenía isoparafinas. Los ensayos

5 inmunohistoquímicos mostraron, como previamente, que las muestras procesadas con la composición objeto de la invención, en la etapa del microscopio, tenían una mejor definición cromogénica en los sitios positivos para antígeno-anticuerpo. Por lo tanto, el procesamiento según la presente invención hace el diagnóstico más fiable, en especial en aquellos casos en los que, para fines de diagnóstico es necesario llevar a cabo un análisis cuantitativo sobre la positividad de la superficie del tejido. Se llevó a cabo el mismo ensayo por el procesamiento tradicional y las conclusiones fueron las mismas, con aspectos morfológicos y reacciones inmunohistoquímicas claramente mejores en el caso del procesamiento con la composición objeto de la invención.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una composición que comprende o consiste en: a) al menos un éster de 2-etilhexilo seleccionado del grupo que consiste en benzoato de 2-etilhexilo, palmitato de 2-etilhexilo, cocoato de 2-etilhexilo, estearato de 2-etilhexilo, acetato de 2-etilhexilo; b) alcohol que consiste en alcohol etílico y/o alcohol isopropílico, para deshidratar y diafanizar una muestra biológica en un procesamiento de muestras biológicas.
2. Uso según la reivindicación 1, en donde la concentración de éster de 2-etilhexilo está en el intervalo de 30 a 70%, la concentración de alcohol etílico está en el intervalo de 20 a 60% y la concentración de alcohol isopropílico está en el intervalo de 10 a 30%, en las que dichos porcentajes son porcentajes en volumen con respecto al volumen total de la composición.
- 10 3. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde la concentración de éster de 2-etilhexilo es 50%, la concentración de alcohol es 35% de alcohol etílico y 15% de alcohol isopropílico, en donde dichos porcentajes son porcentajes en volumen con respecto al volumen total de la composición.
4. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde las muestras biológicas se seleccionan del grupo que consiste en una muestra histológica, citológica, post mortem.
- 15 5. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde las muestras biológicas son muestras que se van a someter a análisis con microscopio, análisis inmunohistoquímico, análisis basado en las técnicas de biología molecular ISH, FISH, CISH, PCR.
- 20 6. Composición de deshidratación y diafanización que comprende o consiste en: a) al menos un éster de 2-etilhexilo seleccionado del grupo que consiste en benzoato de 2-etilhexilo, palmitato de 2-etilhexilo, cocoato de 2-etilhexilo, estearato de 2-etilhexilo, acetato de 2-etilhexilo; b) alcohol que consiste en alcohol etílico y alcohol isopropílico, en donde la concentración de éster de 2-etilhexilo es 50%, 35% de alcohol etílico y 15% de alcohol isopropílico, en donde dichos porcentajes son porcentajes en volumen con respecto al volumen total de la composición.
- 25 7. Método para deshidratar y diafanizar una muestra biológica con una composición que comprende o consiste en: a) al menos un éster de 2-etilhexilo seleccionado del grupo que consiste en benzoato de 2-etilhexilo, palmitato de 2-etilhexilo, cocoato de 2-etilhexilo, estearato de 2-etilhexilo, acetato de 2-etilhexilo; b) alcohol que consiste en alcohol etílico y/o alcohol isopropílico.
- 30 8. Método según la reivindicación 7, en donde la concentración de éster de 2-etilhexilo en dicha composición está en el intervalo de 30 a 70%, la concentración de alcohol etílico está en el intervalo de 20 a 60% y la concentración de alcohol isopropílico está en el intervalo de 10 a 30%, en las que dichos porcentajes son porcentajes en volumen con respecto al volumen total de la composición.
- 35 9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 7-8, en donde la concentración de éster de 2-etilhexilo es 50%, la concentración de alcohol es 35% de alcohol etílico y 15% de alcohol isopropílico, en donde dichos porcentajes son porcentajes en volumen con respecto al volumen total de la composición.
10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en donde dicho tratamiento se produce a una temperatura que está en el intervalo de 30°C a 80°C o a temperatura ambiente.
11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 7-10, en donde dicha muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en una muestra histológica, citológica, post mortem.