



M-TYPER REAGENT KIT

Set 1 + Set 2

IVD

Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro (IVD)

In vitro diagnostic medical device

Instrukcja używania Instructions for Use

Producent / Manufacturer:

**Centrum Medycyny Klinicznej
DiMedical Sp. z o.o.**

Nr wersji IFU / IFU version:

IFU-M-TYPER-001-v1.0

REF

MT-KIT-001

CE **XXXX**

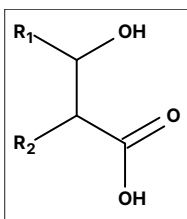
Instrukcja używania POLSKI	3
Instructions for Use ENGLISH	30

Spis treści

1	Wprowadzenie	4
1.1	Zastosowanie wyrobu	4
1.2	Zasada metody	5
2	Składniki zestawu	5
2.1	Informacje dotyczące bezpieczeństwa	5
2.2	Wykaz składników zestawu	6
2.3	Dodatkowe odczynniki (nie wchodzą w skład zestawu)	7
2.4	Kontrola jakości	7
2.5	Utylizacja odpadów laboratoryjnych	8
2.6	Warunki transportu	8
3	Niezbędne wyposażenie	9
3.1	Sprzęt pomocniczy	9
3.2	Rekomendowany sprzęt analityczny	9
4	Przygotowanie systemu pomiarowego	9
4.1	Przygotowanie chromatografu cieczowego	9
4.2	Przygotowanie autosamplera	10
4.3	Przygotowanie spektrometru mas	10
4.4	Weryfikacja zintegrowanego systemu FIA-MS/MS	13
5	Przygotowanie próbki do analizy	15
5.1	Charakterystyka materiału badanego	15
5.2	Przygotowanie próbki	15
5.2.1	Uptynnianie płwociny	15
5.2.2	Izolacja kwasów mikołowych	15
5.2.3	Opcjonalny etap zagęszczania ekstraktu	16
5.3	Przechowywanie przygotowanej próbki	17
6	Analiza próbki	17
6.1	Parametry autosamplera	17
6.2	Program chromatografu cieczowego	17
6.3	Parametry akwizycji danych	18
6.4	Sekwencja analityczna — zalecany porządek nastrzyków	18
6.5	Postępowanie z nieprawidłowym sygnałem w trakcie serii analitycznej	18
7	Interpretacja wyniku	19
7.1	Zasada interpretacji	19
7.2	Kryteria wyniku pozytywnego i negatywnego	19
7.3	Próbki mieszane	20
7.4	Ograniczenia interpretacyjne	20
8	Charakterystyka wydajności	20
8.1	Czułość diagnostyczna	20
8.2	Swoistość diagnostyczna	20
8.3	Granica detekcji	21
8.4	Inne parametry analityczne	21
8.5	Czynniki wpływające na parametry analityczne	22
9	Ograniczenia zestawu	23
9.1	Ograniczenia analityczne	23
9.2	Ograniczenia kliniczne	23
9.3	Ograniczenia techniczne	23
9.4	Warunki przechowywania i transportu wpływające na wyniki	23
10	Literatura	24
11	Substancje niebezpieczne	25
	Sekcja A: Dane producenta	28
	Sekcja B: Zgłaszanie poważnych incydentów	28
	Sekcja C: Objasnienie symboli	29

1 Wprowadzenie

Kwasy mikołowe stanowią jeden z podstawowych składników strukturalnych ściany komórkowej bakterii z podrzędu *Corynebacterineae*. Są to długołańcuchowe α -hydroksy- β -alkilo kwasy tłuszczowe zawierające dwa łańcuchy węglowodorowe: dłuższy łańcuch meromikołowy (R_1) oraz krótszy łańcuch α -węglowodorowy. Prątki z rodzaju *Mycobacterium* cechują się obecnością kwasów mikołowych o długości 60–90 atomów węgla z w pełni nasyconym łańcuchem α -alkilowym (R_2) o ściśle określonej długości 22, 24 lub 26 atomów węgla.

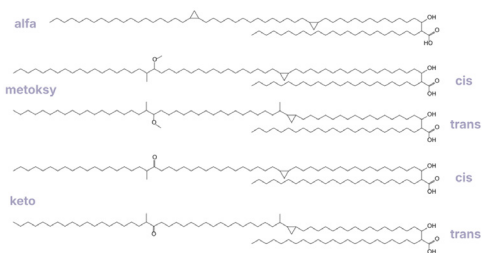


Ryc. 1. Struktura α -hydroksy- β -alkilowych kwasów tłuszczowych.

Badania wykazały, że prątki *Mycobacterium tuberculosis* oraz *Mycobacterium bovis* charakteryzują się zdecydowaną dominacją kwasów mikołowych z łańcuchem α -alkilowym o długości 26 atomów węgla, niezależnie od ich typu. Prątki atypowe wyróżnia natomiast przewaga mikolanów z krótszymi łańcuchami alfa.

Kwasy mikołowe zostały zidentyfikowane jako potencjalne markery detekcji i różnicowania mikobakterii już w latach 80. XX wieku. Stanowią integralną część ściany komórkowej prątków — 20–40% ich suchej masy — i wykazują dobrą stabilność chemiczną. Mogą być wykrywane zarówno z materiału zawierającego żywe mikroorganizmy, jak i z osłon komórkowych lub elementów biofilmu.

Opublikowane badania potwierdzają przydatność analizy kwasów mikołowych metodą tandemowej spektrometrii mas w diagnostyce gruźlicy i mikobakterioz wywoływanych przez prątki atypowe.



Ryc. 2. Rodzaje kwasów mikołowych.

1.1 Zastosowanie wyrobu

Zestaw *M-Typer Reagent Kit* jest wyrobem medycznym do diagnostyki *in vitro* (IVD) przeznaczonym do izolacji kwasów mikołowych z materiału biologicznego — w tym między innymi płwociny — celem ich późniejszej analizy metodą wstrzykowej analizy przepływowej

sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (*FIA-MS/MS*). Metoda ta może stanowić narzędzie wspomagające w diagnostyce chorób wywoływanych przez prątki z rodzaju *Mycobacterium*.

Użytkownik docelowy: Wykwalifikowany personel laboratoryjny w laboratoriach diagnostycznych, posiadający praktyczną znajomość obsługi tandemowego spektrometru mas oraz oprogramowania do analizy danych *MS/MS*.

Ważne: Wynik testu nie stanowi samodzielnej podstawy rozpoznania klinicznego. Powinien być interpretowany łącznie z innymi wynikami badań laboratoryjnych oraz obrazem klinicznym pacjenta.

1.2 Zasada metody

Zestaw ***M-Typer Reagent Kit*** służy do izolacji kwasów mikolowych z materiału badanego. Izolacja przebiega kolejno przez: odpłukanie wolnych lipidów, hydrolizę zasadową, neutralizację oraz ekstrakcję ciecz–ciecz. Uzyskany ekstrakt może zostać bezpośrednio poddany analizie *FIA-MS/MS* lub przechowany do późniejszego badania.

Analiza *FIA-MS/MS* (ang. *flow injection analysis tandem mass spectrometry*) opiera się na bezpośrednim wstrzyknięciu próbki do układu chromatograficznego bez rozdziłu chromatograficznego, jonizacji elektrosprej (ESI) w trybie negatywnym oraz detekcji metodą monitorowania wybranych reakcji fragmentacji (MRM). Każde przejście MRM odpowiada unikalnej strukturze kwasu mikolowego i pozwala na profilowanie składu kwasów mikolowych charakterystycznego dla danego gatunku *Mycobacterium*.

2 Składniki zestawu

2.1 Informacje dotyczące bezpieczeństwa

Składniki zestawu zawierają substancje niebezpieczne. Przed przystąpieniem do pracy należy zapoznać się z kartami charakterystyki (SDS/MSDS). Szczegółowe informacje dotyczące każdego odczynnika znajdują się w kartach charakterystyki (SDS/MSDS) dostępnych na stronie internetowej producenta www.dimedical.pl/.....

▲ OSTRZEŻENIE O SZCZEGÓLNYM ZAGROŻENIU ZDROWIA (CMR): Odczynnik do ekstrakcji (MT-004) zawiera substancje podejrzewane o działanie rakotwórcze (H351) oraz podejrzewane o działanie szkodliwe na dziecko w łonie matki (H361d). Z odczynnikami tym należy obchodzić się ze szczególną ostrożnością. Bezwzględnie unikać wdychania par i kontaktu ze skórą.

Podczas pracy z odczynnikami należy stosować środki ochrony indywidualnej:

- rękawice jednorazowe (zalecane nitrylowe),
- fartuch laboratoryjny,
- okulary ochronne.

Wszystkie czynności z odczynnikami należy wykonywać pod wyciągiem chemicznym. Ze względu na odmienne właściwości chemiczne składników zestaw jest dostarczany w dwóch oddzielnych opakowaniach: **Set 1** oraz **Set 2**.

Szczegółowy wykaz zwrotów wskazujących rodzaj zagrożenia i środków ostrożności (GHS/CLP) dla poszczególnych odczynników znajduje się w Załączniku na końcu niniejszej instrukcji.

2.2 Wykaz składników zestawu

Wszystkie składniki należy przechowywać zgodnie z warunkami podanymi poniżej oraz na etykiecie każdego odczynnika.

Tabela 1A. Składniki zestawu — Set 1.

Nr katalogowy	Opis	Czynne składniki / skład	Warunki przechowywania	Stabilność po otwarciu
MT-001	Odczynnik do płukania	Główny składnik: izopropanol. Klasa chemiczna: alkohol alifatyczny. Funkcja: odpłukanie wolnych lipidów.	2–25°C	30 dni w 2–8°C
MT-002	Odczynnik do hydrolizy	Główny składnik: zasadowy roztwór wodorotlenku potasu w alkoholu. Klasa chemiczna: silna zasada nieorganiczna w mieszaninie alkoholowej. Funkcja: hydroliza alkaliczna materiału.	2–25°C	30 dni w 2–8°C
MT-004	Odczynnik do ekstrakcji	Główny składnik: chloroform. Klasa chemiczna: chlorowany rozpuszczalnik organiczny. Funkcja: ekstrakcja ciecz–ciecz kwasów mikolowych.	2–25°C	30 dni w 2–8°C
MT-005	Odczynnik do rozcieńczeń	Główny składnik: mieszanina alkoholowa z dodatkiem fluorku amonu. Klasa chemiczna: mieszanina alkoholowa z dodatkiem soli nieorganicznej. Funkcja: rozcieńczenie i przygotowanie ekstraktu do analizy FIA-MS/MS.	2–25°C	30 dni w 2–8°C

Tabela 1B. Składniki zestawu — Set 2.

Nr katalogowy	Opis	Czynne składniki / skład	Warunki przechowywania	Stabilność po otwarciu
MT-003	Odczynnik do neutralizacji	Główny składnik: roztwór kwasu chlorowodorowego. Klasa chemiczna: kwas nieorganiczny. Funkcja: neutralizacja po etapie hydrolizy.	2–25°C	30 dni w 2–8°C

Jeden kompletny zestaw **M-Typer Reagent Kit (Set 1 + Set 2)** jest przeznaczony do wykonania 100 analiz izolacji kwasów mikolowych.

Odczynnik do neutralizacji (**MT-003**) jest dostarczany w oddzielnym opakowaniu (**Set 2**) ze względu na wymagania bezpieczeństwa dotyczące transportu odczynników o odmiennych właściwościach chemicznych. Oba opakowania łącznie stanowią kompletny zestaw niezbędny do przeprowadzenia procedury izolacji kwasów mikolowych.

Trwałość zamkniętych odczynników:

Zamknięte odczynniki wchodzące w skład zestawu **M-Typer**

Reagent Kit (Set 1 i Set 2), przechowywane w temperaturze 2–25°C, zachowują stabilność przez 12 miesięcy od daty produkcji.

Po pierwszym otwarciu odczynnika należy:

- przechowywać w temperaturze 2–8°C,
- szczelnie zamykać opakowanie po każdym użyciu,
- zużyć w ciągu **30 dni od pierwszego otwarcia**.

Uwaga: Nie zamrażać zestawu ani żadnego z jego składników!

2.3 Dodatkowe odczynniki (nie wchodzą w skład zestawu)

Do przeprowadzenia pomiarów *FIA-MS/MS* niezbędne są dodatkowe odczynniki, które nie są dostarczane w zestawie:

- *metanol*, jakość co najmniej *LC-MS/MS* (faza ruchoma A — MPA)
- *chloroform* stabilizowany etanolem, jakość co najmniej *LC-MS/MS* (faza ruchoma B — MPB oraz rozpuszczalnik płuczący)
- *2-propanol*, jakość co najmniej *LC-MS/MS*
- 1% *N-acetylo-cysteina* w 4% wodorotlenku sodu
- sterylny bufor fosforanowy 0,067 mol/l, pH 6,8
- 5% roztwór Tweenu 80.

Ponadto wymagane są następujące materiały zużywalne o znaczeniu krytycznym:

- wialki chromatograficzne z zakrętkami i nienaciętą septą teflonową (1,5 ml / 2 ml),
- probówki typu Falcon 50 ml do hydrolizy i ekstrakcji, przeznaczone do inkubacji w temperaturze 90°C.

2.4 Kontrola jakości

Kontrola przez producenta: każda seria zestawu jest testowana przez producenta pod kątem zgodności ze specyfikacją jakościową przed dopuszczeniem do obrotu.

Kontrola przez użytkownika — podczas rutynowego stosowania zestawu zaleca się:

- wykonywanie analizy prób ślepych (blank) co najmniej raz na 10 analiz próbek rzeczywistych,
- okresowe wykonywanie analizy roztworu referencyjnych kwasów miksowych w celu weryfikacji poprawności działania systemu *FIA-MS/MS*,
- monitorowanie kształtu sygnału chromatograficznego oraz stosunku sygnału do szumu.

Prawidłowy sygnał analityczny powinien spełniać kryteria opisane w sekcji 4.4, w tym pojawiać się w zakresie 0,05–0,30 min i charakteryzować się profilem typu *hump-shape* (kształt garbu).

W przypadku stwierdzenia sygnału w próbie ślepej lub zaburzenia kształtu sygnału należy:

1. sprawdzić czystość faz ruchomych
2. przepłukać układ chromatograficzny
3. powtórzyć analizę

2.5 Utylizacja odpadów laboratoryjnych

Wszystkie odpady, w tym szczelnie zamknięte butelki z przeterminowanymi odczynnikami, są klasyfikowane jako odpady chemiczne, niebezpieczne (kod 18 01 06*). Nieotworzone opakowania należy wyrzucać w całości; roztwory należy zbierać do szczelnie zamkniętych pojemników szklanych i przekazywać do utylizacji.

Szczegółowe informacje dotyczące unieszkodliwiania poszczególnych odczynników znajdują się w sekcji 13 odpowiadających im kart *SDS/MSDS*.

Materiał badany użyty do analizy — niezależnie od jego charakterystyki — należy traktować jako potencjalnie zakaźny i utylizować zgodnie z lokalnymi przepisami dotyczącymi odpadów medycznych (kod 18 01 03*).

2.6 Warunki transportu

Zestaw należy transportować w temperaturze 2–25°C. Krótkotrwałe odchylenia temperatury podczas transportu nie powinny przekraczać zakresu 2–30°C. Ze względu na właściwości chemiczne składników zestaw ***M-Typer Reagent Kit*** jest transportowany w dwóch oddzielnych opakowaniach: ***Set 1*** i ***Set 2***. Chronić przed światłem i uszkodzeniami mechanicznymi.

3 Niezbędne wyposażenie

3.1 Sprzęt pomocniczy

Do przeprowadzenia procedury izolacji kwasów mikolowych z materiału biologicznego z użyciem zestawu **M-Typer Reagent Kit** wymagany jest następujący sprzęt laboratoryjny:

Sprzęt	Specyfikacja
Wirówka laboratoryjna	Wyposażona w rotor dla probówek 50 ml; prędkość min. 4500 rpm. Zalecana wirówka chłodzona (4°C), dopuszczalna praca w temperaturze pokojowej
Wytrząsarka typu worteks	Standardowa
Horyzontalna wytrząsarka laboratoryjna	Do inkubacji 30 min w temp. pokojowej
Blok grzejny lub łaźnia wodna	Umożliwiający inkubację probówek w 90°C
Pipeta automatyczna	Zakres 100–1000 µl

3.2 Rekomendowany sprzęt analityczny

Do analizy *FIA-MS/MS* wyizolowanych kwasów mikolowych producent rekomenduje następujący system analityczny:

Element systemu	Specyfikacja
Pompy analityczne HPLC	Zestaw binarnych pomp analitycznych (binary pump)
Autosampler	Przystosowany do wialek 1,5 ml / 2 ml z septą teflonową nienaciętą; zakres nastrzyku 1–50 µl
Tandemowy spektrometr mas	Typ: potrójny kwadrupol (QqQ) ze źródłem jonów ESI, pracujący w trybie jonizacji negatywnej, umożliwiający analizę <i>FIA-MS/MS</i> z monitorowaniem przejść MRM. Wymagania minimalne: czułość detekcji jonów nie gorsza niż dla platform referencyjnych (<i>Sciex QTRAP® 6500</i> , <i>Shimadzu LCMS-8050</i>). Przykładowe platformy: <i>QTRAP® 6500 (Sciex)</i> , <i>LCMS-8050 (Shimadzu)</i> lub system równoważny spełniający powyższe kryteria.
Kapilara połączeniowa	PEEK, długość 50 cm, średnica wewnętrzna 100 µm

4 Przygotowanie systemu pomiarowego

4.1 Przygotowanie chromatografu cieczowego

Procedura jest przeznaczona dla średnio- i wysokociśnieniowych chromatografów cieczowych wyposażonych w zestaw dwóch pomp binarnych.

Przed przystąpieniem do analiz należy przygotować chromatograf zgodnie z poniższą procedurą:

1. Jeśli chromatograf pracował wcześniej z innymi fazami ruchomymi niż stosowane w niniejszej analizie — prze-

- płukać (purge) kanały obu pomp binarnych, w pierwszej kolejności wyłącznie z użyciem Fazy Ruchomej A (MPA).
2. Po przepłukaniu pompą A — podłączyć Fazę Ruchomą B (MPB) do kanału B i wykonać purge kanału B.
 3. Jeśli chromatograf pracował wcześniej z fazami zgodnymi z niniejszą procedurą — podłączyć MPA i MPB bezpośrednio do odpowiednich pomp i przejść do kroku 4.
 4. Zalecane ustawienia ściśliwości: pompa A — 1,25 GPa; pompa B — 1,60 GPa (jeśli oprogramowanie chromatografu na to pozwala).

Uwaga: Analiza prowadzona jest w warunkach absolutnie bezwodnych. Przed przystąpieniem do analiz należy pozbyć się ze wszelkich elementów systemu chromatograficznego pozostałości wody. Można do tego celu wykorzystać Fazę Ruchomą A lub 2-propa-nol (o czystości co najmniej LC-MS/MS grade).

4.2 Przygotowanie autosamplera

Procedura jest przeznaczona dla autosamplarów umożliwiających płukanie co najmniej jednym roztworem płuczącym oraz wykonywanie nastrzyków w zakresie 1–50 µl z wialek 1,5 ml / 2 ml z nienaciętą septą teflonową.

1. Jeśli autosampler pracował wcześniej z innymi roztworami płuczącymi niż stosowane w niniejszej analizie — przepłukać go wyłącznie z użyciem Fazy Ruchomej A (MPA).
2. Po przepłukaniu — podłączyć Wash Solvent i wykonać purge.
3. Połączyć autosampler bezpośrednio z pompą i ze spektrometrem mas przy użyciu kapilary PEEK (50 cm / 100 µm i.d.).

Uwaga: Odstępstwa od zalecanej specyfikacji kapilary mogą skutkować różnicami w kształcie sygnału lub przesunięciem czasów pojawiania się sygnałów analitycznych.

4.3 Przygotowanie spektrometru mas

Procedura jest przeznaczona dla tandemowych spektrometrów mas typu potrójny kwadrupol (QqQ) wyposażonych w źródło jonów elektrosprej (ESI). Ze względu na czułość metody rekomenduje się stosowanie możliwie najczulszych dostępnych urządzeń.

Przed przystąpieniem do analiz należy zoptymalizować parametry detekcji spektrometru mas. Poniżej podano parametry rekomendowane dla urządzeń QTRAP® 6500 (Sciex) i LCMS-8050 (Shimadzu). Celem dokładnej optymalizacji parametrów detekcji jonów rekomenduje się użycie komercyjnie dostępnej mieszaniny kwasów mikołowych (np. Mycolic acid from *Mycobacterium tuberculosis* (bovine strain) (Product Specification [37281-34-8], Arctomsci).

Tabela 2A. Parametry źródła jonów — Sciex QTRAP® 6500.

Parametr	Wartość
Gaz kurtynowy (CUR)	20 psi
Temperatura źródła jonów (TEMP)	450°C
Gaz nebulizujący (GS1)	50 psi
Gaz osuszający (GS2)	70 psi
Jonizacja	Negatywna (NEG)
Napięcie na elektrodzie (IS)	-4500 V

Tabela 2B. Parametry źródła jonów — Shimadzu LCMS-8050.

Parametr	Wartość
Temperatura interface'u	350°C
Temperatura źródła jonów (desolvation)	600°C
Temperatura DL	250°C
Przepływ gazu nebulizującego	3 L/min
Przepływ gazu ogrzewającego	10 L/min
Przepływ gazu osuszającego	10 L/min
Tryb jonizacji	Negatywna (NEG)
Rozdzielczość Q1	Niska (Low)
Rozdzielczość Q3	Jednostkowa (Unit)

Tabela 3A. Parametry transmisji jonów (przejścia MRM) — Sciex QTRAP® 6500.

Q1 mass [m/z]	Q3 mass [m/z]	Declustering potential [V]	Collision energy [V]
885.9	339.4	-150	-60
913.9	367.4	-150	-62
914	339.4	-150	-60
915.9	367.4	-150	-68
929.9	367.4	-150	-69
942	395.4	-150	-65
942.1	367.4	-150	-64
943.9	367.4	-150	-68
957.9	367.4	-150	-69
958	339.4	-150	-73
970	367.4	-150	-73
970	395.4	-150	-67
971.9	367.4	-150	-73
985.9	367.4	-150	-73
998	395.4	-150	-68
1000	395.4	-150	-75
1014	367.4	-150	-77
1024.1	367.4	-150	-70
1028.1	395.4	-150	-77
1038.1	395.4	-150	-72
1052.1	339.4	-150	-70
1052.1	367.4	-150	-70
1080.1	367.4	-150	-74
1096.1	367.4	-150	-72
1108.1	367.4	-150	-72
1122.2	367.4	-150	-74
1124.1	395.4	-150	-74

Q1 mass [m/z]	Q3 mass [m/z]	Declustering potential [V]	Collision energy [V]
1136.1	367.4	-150	-74
1136.2	339.4	-150	-74
1136.2	395.4	-150	-74
1150.2	367.4	-150	-74
1152.2	367.4	-150	-74
1164.2	367.4	-150	-74
1164.2	395.4	-150	-74
1166.2	367.4	-150	-74
1178.2	367.4	-150	-74
1180.2	367.4	-150	-74
1180.2	395.4	-150	-74
1192.2	367.4	-150	-74
1192.2	395.4	-150	-74
1194.2	339.4	-150	-74
1194.2	367.4	-150	-74
1196.2	395.4	-150	-74
1220.2	395.4	-150	-74
1222.2	367.4	-150	-74
1222.2	395.4	-150	-74
1250.2	367.4	-150	-74
1250.2	395.4	-150	-74
1252.2	395.4	-150	-74
1264.3	395.4	-150	-74
1280.2	395.4	-150	-74
1294.3	395.4	-150	-74

Tabela 3B. Parametry transmisji jonów (przejścia MRM)
— Shimadzu LCMS-8050.

Q1 mass [m/z]	Q3 mass [m/z]	Dwell time [msec]	Q1 pre bias [V]	Collision energy [V]	Q3 pre bias [V]
885.9	339.4	6	30	62	20
913.9	367.4	6	30	62	20
914	339.4	6	30	62	20
915.9	367.4	6	30	62	20
929.9	367.4	6	30	62	20
942	395.4	6	30	62	20
942.1	367.4	6	30	62	20
943.9	367.4	6	30	62	20
957.9	367.4	6	30	62	20
958	339.4	6	30	62	20
970	367.4	6	30	62	20
970	395.4	6	30	62	20
971.9	367.4	6	30	62	20
985.9	367.4	6	30	62	20
998	395.4	6	30	62	20
1000	395.4	6	30	62	20
1014	367.4	6	30	62	20
1024.1	367.4	6	30	62	20
1028.1	395.4	6	30	62	20
1038.1	395.4	6	30	62	20
1052.1	339.4	6	30	62	20
1052.1	367.4	6	30	62	20
1080.1	367.4	6	30	62	20
1096.1	367.4	6	30	62	20
1108.1	367.4	6	30	62	20
1122.2	367.4	6	30	62	20
1124.1	395.4	6	30	62	20
1136.1	367.4	6	30	62	20
1136.2	339.4	6	30	62	20
1136.2	395.4	6	30	62	20
1150.2	367.4	6	30	62	20
1152.2	367.4	6	30	62	20

Q1 mass [m/z]	Q3 mass [m/z]	Dwell time [msec]	Q1 pre bias [V]	Collision energy [V]	Q3 pre bias [V]
1164.2	367.4	6	30	62	20
1164.2	395.4	6	30	62	20
1166.2	367.4	6	30	62	20
1178.2	367.4	6	30	62	20
1180.2	367.4	6	30	62	20
1180.2	395.4	6	30	62	20
1192.2	367.4	6	30	62	20
1192.2	395.4	6	30	62	20
1194.2	339.4	6	30	62	20
1194.2	367.4	6	30	62	20
1196.2	395.4	6	30	62	20
1220.2	395.4	6	30	62	20
1222.2	367.4	6	30	62	20
1222.2	395.4	6	30	62	20
1250.2	367.4	6	30	62	20
1250.2	395.4	6	30	62	20
1252.2	395.4	6	30	62	20
1264.3	395.4	6	30	62	20
1280.2	395.4	6	30	62	20
1294.3	395.4	6	30	62	20

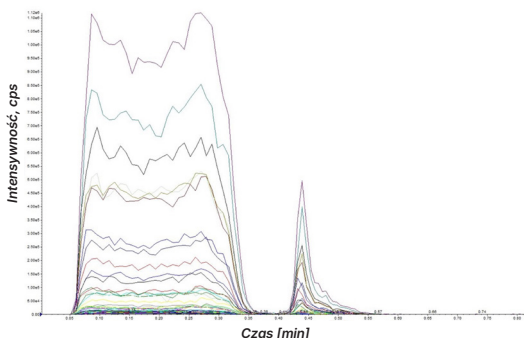
4.4 Weryfikacja zintegrowanego systemu FIA-MS/MS

Po przygotowaniu oraz zoptymalizowaniu parametrów systemu *FIA-MS/MS* zgodnie z instrukcjami zawartymi w punktach 4.1 – 4.3 należy zweryfikować poprawność jego działania poprzez przeprowadzenie analizy *FIA-MS/MS* roztworu komercyjnie dostępnych kwasów mikołowych rozcieńczonych w odczynniku **MT-004**.

Analizę należy przeprowadzić w sposób tożsamy z analizą próbki badanej.

Sygnał od badanych substancji, przyjmujący kształt tzw. garbu (*ang. hump-shape*), powinien pojawić się na chromatogramie nie wcześniej niż w czasie 0,05 min. Całkowity czas trwania sygnału, liczony od momentu jego pojawienia się do powrotu do poziomu bazowego, nie powinien przekraczać 0,30 min. Kształt sygnału powinien charakteryzować się stromym wzrostem i spadkiem, pomiędzy którymi sygnał utrzymuje się na względnie stałym poziomie. Region plateau powinien być opisany co najmniej 10 punktami pomiarowymi.

Odstępstwa od oczekiwanego kształtu sygnału mogą wynikać z różnic w objętościach martwych systemu *FIA-MS/MS*. Można je skorygować parametrami nastrzyku (objętość i szybkość nastrzyku) oraz długością i/ lub średnicą kapilary PEEK łączącej autosampler ze spektrometrem mas.



Ryc. 3. Przykładowy chromatogram FIA-MS/MS przedstawiający dodatni wynik analizy.

Uwaga: Dodatkowy mniejszy sygnał widoczny na rycinie po głównym pikie nie ma znaczenia diagnostycznego. Ma charakter techniczny, związany z przebiegiem analizy FIA-MS/MS i właściwościami układu pomiarowego. Przy ocenie poprawności sygnału i interpretacji wyniku należy uwzględnić wyłącznie główny sygnał analityczny.

5 Przygotowanie próbki do analizy

5.1 Charakterystyka materiału badanego

Materiałem badanym do izolacji kwasów mikolowych może być każdy materiał potencjalnie zawierający prątki z rodzaju *Mycobacterium*, ich fragmenty ścian komórkowych lub elementy biofilmu.

Rekomendowane rodzaje materiału badanego:

- plwocina,
- popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe (BAL),
- osad komórkowy z hodowli bakteryjnych na podłożach stałych lub płynnych.

W uzasadnionych przypadkach laboratoryjnych możliwe jest również zastosowanie innych materiałów, pod warunkiem ich uprzedniej walidacji przez laboratorium.

5.2 Przygotowanie próbki

5.2.1 Uptynnianie plwociny

Plwocinę przed izolacją kwasów mikolowych należy uptynnić zgodnie z poniższą procedurą:

1. Odmierzyć **2 ml** plwociny i przenieść do probówki Falcon 50 ml.
2. Dodać równą objętość (**2 ml**) roztworu 1% N-acetylocysteiny w 4% wodorotlenku sodu.
3. Inkubować w temperaturze pokojowej przez **20 min**, okresowo mieszając.
4. Po inkubacji uzupełnić objętość próbki sterylnym buforem fosforanowym 0,067 mol/l (pH 6,8) do objętości końcowej około **50 ml** oraz dodać **1–2 krople** 5% roztworu Tweenu 80.
5. Zamknąć probówkę i wymieszać zawartość przez kilkukrotne odwrócenie.
6. Odwirować w temperaturze **4°C** przez **20 min** przy 4500 rpm.
7. Zlać supernatant. Uzyskany osad komórkowy poddać dalszej obróbce zgodnie z sekcją 5.2.2.

5.2.2 Izolacja kwasów mikolowych

Poniższą procedurę stosuje się do osadu komórkowego uzyskanego po uptynnieniu plwociny (sekcja 5.2.1) lub do osadu komórkowego uzyskanego z innych materiałów badanych.

Poniższą procedurę należy prowadzić w tej samej probówce typu Falcon 50 ml, w której po odwirowaniu uzyskano osad komórkowy.

Uwaga: Procedura uptynniania z użyciem N-acetylocysteiny (sekcja 5.2.1) dotyczy wyłącznie plwociny. W przypadku materiału z hodowli bakteryjnych oraz innych materiałów, z których uzyskano osad komórkowy, procedurę izolacji kwasów mikolowych należy prowadzić bezpośrednio od etapu uzyskanego osadu komórkowego.

Krok	Czynność
1	Dodać 2 ml odczynnika do płukania (MT-001). Wortexować 30 s, następnie odwirować w temperaturze pokojowej lub 4°C przez 20 min przy 4500 rpm. Odcłać supernatant.
2	Do odplukanego osadu dodać 2 ml odczynnika do hydrolizy (MT-002). Szczelnie zamknąć probówkę i inkubować w 90°C przez 60 min.
3	Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej dodać 2 ml odczynnika do neutralizacji (MT-003, Set 2). Uwaga: z roztworu wytrąci się osad — jest to zjawisko prawidłowe.
4	Dodać 2 ml odczynnika do ekstrakcji (MT-004).
5	Prowadzić ekstrakcję przez 30 min na wytrząsarce horyzontalnej.
6	Po rozdzieleniu faz przenieść całą dolną warstwę chloroformową do wialki autosamplerowej o pojemności 1,5 ml . Objętość przenoszonych fazy wynosi zwykle około 1,5 ml . Uwaga: do dalszych etapów należy pobierać wyłącznie dolną warstwę. Pobranie materiału z górnej warstwy może niekorzystnie wpływać na jakość sygnału analitycznego. Na tym etapie próbka może zostać czasowo przechowana przed dalszym przygotowaniem do analizy, zgodnie z warunkami przechowywania określonymi w instrukcji.
7	Z wialki autosamplerowej zawierającej przeniesioną dolną fazę pobrać 250 µl próbki i przenieść do nowej wialki chromatograficznej. Następnie dodać 250 µl odczynnika do rozcieńczeń (MT-005).
8	Mieszać na wortexie przez 30 s. Próbka jest gotowa do analizy FIA-MS/MS .

5.2.3 Opcjonalny etap zagęszczania ekstraktu

W przypadku materiałów o przewidywanej niskiej zawartości kwasów mikołowych, w szczególności materiałów skąpoprątkowych, takich jak płyn mózgowo-rdzeniowy, mocz lub inne materiały pozapłucne, dopuszcza się zastosowanie dodatkowego etapu zagęszczania ekstraktu po zakończeniu izolacji kwasów mikołowych.

Etap ten polega na częściowym lub całkowitym odparowaniu dolnej fazy chloroformowej zawierającej wyizolowane kwasy mikołowe, przeniesionej wcześniej do wialki autosamplerowej zgodnie z punktem 6 procedury podstawowej. Odparowanie może być prowadzone w strumieniu azotu lub w innych kontrolowanych warunkach laboratoryjnych, zapewniających bezpieczne usunięcie rozpuszczalnika bez degradacji analitów.

Po odparowaniu rozpuszczalnika w wialce pozostaje sucha pozostałość po ekstrakcji. Przed analizą **FIA-MS/MS** pozostałość należy ponownie rozpuścić poprzez dodanie do wialki:

250 µl odczynnika MT004 — odczynnik do ekstrakcji
oraz

250 µl odczynnika MT005 — odczynnik do rozcieńczeń.

Po dodaniu odczynników wialkę należy dokładnie wymieszać, aby zapewnić pełną rekonstrukcję pozostałości i uzyskanie jednorodnej próbki końcowej. Tak przygotowana próbka jest gotowa do analizy metodą **FIA-MS/MS**.

Celem procedury jest zwiększenie stężenia analitów w końcowej próbce przeznaczanej do analizy, co może poprawić wykrywalność sygnałów analitycznych w

materiałach o niskim obciążeniu biologicznym.

Etap ma charakter opcjonalny i powinien zostać zwalidowany przez laboratorium dla danego rodzaju materiału klinicznego.

5.3 Przechowywanie przygotowanej próbki

Przygotowana próbka (wialka z frakcją po ekstrakcji) może być przechowywana przed analizą w temperaturze około **-70°C** przez okres nie dłuższy niż **1 rok kalendarzowy**. Przed wykonaniem analizy próbkę należy wyjąć z zamrażarki i doprowadzić do temperatury pokojowej.

6 Analiza próbki

Analizę próbki metodą *FIA-MS/MS* należy przeprowadzić po przygotowaniu i weryfikacji systemu pomiarowego zgodnie z sekcjami 4.1–4.4 oraz po przygotowaniu próbki zgodnie z sekcją 5.

6.1 Parametry autosamplera

Tabela 4. Parametry nastrzyku.

Parametr	Wartość
Objętość nastrzyku	50 µl
Szybkość nastrzyku	10 µl/s
Temperatura autosamplera	8°C

Uwaga: Temperatura autosamplera **8°C** jest parametrem krytycznym dla stabilności próbki i prawidłowego przebiegu analizy. Przekroczenie tej wartości może niekorzystnie wpływać na jakość sygnału analitycznego oraz wiarygodność wyniku.

6.2 Program chromatografu cieczowego

Tabela 5. Program gradientowy.

Czas [min]	Faza ruchoma A [%]	Faza ruchoma B [%]	Przepływ [ml/min]
0,00	40	60	0,25
0,39	40	60	0,25
0,40	0	100	1,00
0,90	0	100	1,00
1,00	40	60	1,00

Całkowity czas trwania analizy jednej próbki: **1 minuta**.

Uwaga: Zmiana przepływu z 0,25 ml/min do 1,00 ml/min między 0,39 a 0,40 min stanowi parametr krytyczny metody i nie powinna być zmieniana.

6.3 Parametry akwizycji danych

Analizę należy przeprowadzać w trybie monitorowania wybranych reakcji fragmentacji (MRM), zgodnie z parametrami transmisji jonów podanymi w tabelach 3A i 3B (sekcja 4.3).

Do przeprowadzenia analizy i akwizycji danych MRM wymagane jest oprogramowanie producenta danego spektrometru mas, właściwe dla danej platformy sprzętowej, np. **Analyst** dla systemów Sciex lub **LabSolutions** dla systemów Shimadzu. Inne oprogramowanie do akwizycji danych MRM nie jest przewidziane w ramach zatwierdzonej procedury.

Do obróbki uzyskanych wyników dopuszcza się oprogramowanie do integracji sygnałów chromatograficznych, umożliwiające generowanie raportów w formacie **TXT** lub **CSV**, np. **MultiQuant** dla systemów Sciex lub rozwiązania równoważne.

Interpretacja wyników odbywa się wyłącznie z wykorzystaniem dedykowanego oprogramowania **M-Typer Software**.

6.4 Sekwencja analityczna — zalecany porządek nastrzyków

Dla zapewnienia wiarygodności wyników zaleca się stosowanie następującej sekwencji nastrzyków w serii analitycznej:

1. Próba ślepa (blank) — odczynnik do ekstrakcji (**MT-004**) przeniesiony do odpowiedniej wialki chromatograficznej — weryfikacja czystości tła analitycznego.
2. Roztwór referencyjnych kwasów mikołowych — weryfikacja sprawności systemu *FIA-MS/MS* (zgodnie z sekcją 4.4).
3. Próbkki badane.
4. Próba ślepa (blank) — analizę próbek badanych należy przeplatać próbą ślepą co najmniej raz na 10 analiz próbek rzeczywistych.

6.5 Postępowanie z nieprawidłowym sygnałem w trakcie serii analitycznej

W przypadku stwierdzenia nieprawidłowości w trakcie serii analitycznej należy:

Obserwacja	Działanie
Sygnał w próbce ślepej	Sprawdzić czystość faz ruchomych → przepłukać układ → powtórzyć blank
Brak sygnału lub sygnał poniżej oczekiwanego	Sprawdzić objętość i szybkość nastrzyku → sprawdzić parametry MRM → powtórzyć weryfikację systemu (sekcja 4.4)
Zaburzony kształt sygnału (brak plateau)	Skorygować parametry nastrzyku lub długość/średnicę kapilary PEEK (sekcja 4.2)
Sygnał pojawia się poza oknem 0,05–0,30 min	Sprawdzić przepływ faz ruchomych → zweryfikować program gradientowy (tabela 5)

7 Interpretacja wyniku

7.1 Zasada interpretacji

Zestaw **M-Typer Reagent Kit** służy do izolacji kwasów mikolowych z materiału biologicznego. Interpretację wyniku przeprowadza się na podstawie porównania profilu kwasów mikolowych próbki badanej z profilem referencyjnym.

Każde monitorowane przejście MRM odpowiada sygnałowi charakterystycznemu dla określonych kwasów mikolowych związanych z prątkami z rodzaju *Mycobacterium*. Uśrednione i znormalizowane dane pomiarowe (profil kwasów mikolowych) próbki badanej porównuje się z profilem referencyjnym przy użyciu dedykowanego oprogramowania **M-Typer Software**.

M-Typer Software stanowi odrębny wyrób medyczny do diagnostyki in vitro (IVD), posiadający własne oznakowanie CE. Szczegółowe informacje dotyczące interpretacji wyników, klasyfikacji profilu oraz różnicowania taksonomicznego zawiera instrukcja używania oprogramowania **M-Typer Software**.

Różnicowanie wyników na odpowiednim poziomie taksonomicznym, w tym rozróżnienie *Mycobacterium tuberculosis* od prątków atypowych, wymaga zastosowania oprogramowania **M-Typer Software** i nie stanowi samodzielnej funkcji zestawu **M-Typer Reagent Kit**.

7.2 Kryteria wyniku pozytywnego i negatywnego

Wynik analizy FIA-MS/MS interpretuje się jako:

- **Wynik wskazujący na obecność prątków z rodzaju *Mycobacterium***
Uzyskanie sygnału o kształcie tzw. garbu (*ang. hump-shape*), opisanego co najmniej 10 punktami pomiarowymi w regionie plateau, o intensywności wynoszącej co najmniej 10-krotność obserwowanego szumu tła ($S/N \geq 10$) dla danego przejścia MRM, mierzonego przed pojawieniem się sygnału w przedziale od 0,00 do 0,05 min. Za wynik dodatni uznaje się uzyskanie takiego sygnału dla co najmniej 1 z 52 monitorowanych przejść MRM.
- **Wynik niejednoznaczny / wątpliwy**
Uzyskanie sygnału o kształcie tzw. garbu (*ang. hump-shape*), opisanego co najmniej 10 punktami pomiarowymi w regionie plateau, o intensywności większej niż 3-krotność i mniejszej niż 10-krotność obserwowanego szumu tła ($3 \leq S/N < 10$) dla danego przejścia MRM, mierzonego przed pojawieniem się sygnału w przedziale od 0,00 do 0,05 min. Za wynik wątpliwy uznaje się uzyskanie takiego sygnału dla co najmniej 1 z 52 monitorowanych przejść MRM.
- **Wynik wskazujący na brak prątków z rodzaju *Mycobacterium***
Brak uzyskania sygnału spełniającego powyższe kryteria dla któregośkolwiek z 52 monitorowanych przejść MRM, tj. brak sygnału o kształcie tzw. garbu (*ang. hump-shape*), opisanego co najmniej 10 punktami pomiarowymi

w regionie plateau, o intensywności przekraczającej 3-krotność obserwowanego szumu tła ($S/N < 3$).

Uwaga: Końcowa interpretacja diagnostyczna uzyskanego profilu kwasów mikolowych, w tym jego klasyfikacja i różnicowanie na odpowiednim poziomie taksonomicznym, wymaga zastosowania dedykowanego oprogramowania *M-Typer Software*.

7.3 Próbk mieszane

W przypadku obecności więcej niż jednego gatunku lub szczepu prątków z rodzaju *Mycobacterium* w próbce badanej uzyskany profil kwasów mikolowych może odzwierciedlać sygnał mieszany, proporcjonalny do ilościowego udziału poszczególnych składników próbki. Może to bezpośrednio wpływać na końcową interpretację wyniku i różnicowanie taksonomiczne, które powinno być wykonywane z użyciem dedykowanego oprogramowania *M-Typer Software*.

7.4 Ograniczenia interpretacyjne

Wynik badania z użyciem zestawu *M-Typer Reagent Kit*:

- **nie stanowi samodzielnej podstawy rozpoznania klinicznego** — powinien być interpretowany łącznie z innymi wynikami badań laboratoryjnych oraz obrazem klinicznym pacjenta,
- **nie zastępuje** hodowli bakteryjnej ani innych standardowych metod identyfikacji prątków,
- jest zależny od jakości materiału badanego, prawidłowości izolacji kwasów mikolowych oraz sprawności systemu *FIA-MS/MS*.

8 Charakterystyka wydajności

8.1 Czułość diagnostyczna

Czułość diagnostyczną wyznaczono na podstawie badania obejmującego **199 materiałów klinicznych** pochodzących z Wojewódzkiego Zespołu Zakładów Opieki Zdrowotnej Centrum Leczenia Chorób Płuc i Rehabilitacji w Łodzi. Badany materiał obejmował: **131 plwocin, 45 bronchoaspiratów, 15 płynów opłucnowych, 1 materiał z biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej płuca, 5 płynów z cewników oskrzelowych oraz 1 próbkę moczu.**

Na podstawie łącznej analizy wyników klasycznych, genetycznych oraz *LC-MS/MS* wytypowano **36 próbek dodatnich**, stanowiących punkt odniesienia do oceny czułości diagnostycznej. Dla *LC-MS/MS* uzyskano **33 wyniki dodatnie**, co odpowiada czułości diagnostycznej na poziomie **92%**.

8.2 Swoistość diagnostyczna

Swoistość diagnostyczną wyznaczono na podstawie analizy:

- 94 próbek płwociny pobranych od osób zdrowych
- 88 próbek płwociny pobranych od osób z nieprątkowym zapaleniem płuc
- 7 próbek hodowli bakterii spoza rodzaju *Mycobacterium*:
 - *Rhodococcus equi*
 - *Nocardia asteroides*
 - *Corynebacterium glutamicum*
 - *Dietzia maris*
 - *Gordonia bronchialis*
 - *Gordonia sputi*
 - *Tsukamurella paurometabola*

W żadnej z badanych próbek nie stwierdzono wyniku fałszywie dodatniego. Swistość diagnostyczna wynosi **100%**.

8.3 Granica detekcji

Granica detekcji (**LOD**) metody została zdefiniowana jako sygnał spełniający kryterium $S/N \geq 3$, natomiast granica oznaczalności (**LOQ**) jako sygnał spełniający kryterium $S/N \geq 6$. Czułość analityczna metody określona została na poziomie 5–50 CFU/ml.

Dla wybranych szczepów wyznaczono następujące przykładowe wartości liczbowe granicy detekcji i granicy oznaczalności, wyrażone jako liczba komórek na próbkę:

Szczep	LOD [komórki/ próbkę]	LOQ [komórki/ próbkę]
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6	16
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	2	10
<i>Mycobacterium abscessus</i>	4	13

8.4 Inne parametry analityczne

Parametr	Wartość
Odzysk	96–104%
Precyzja metody LC-MS/MS	1–3%
Powtarzalność procedury	2–5%
Odtwarzalność	8–16%

Uwaga: Pełna ilościowa charakterystyka interferencji analitycznych nie była przedmiotem odrębnego badania walidacyjnego. Z praktyki analitycznej wiadomo, że potencjalne sygnały zakłócające mogą pochodzić od niektórych plastyfikatorów lub związków ekstrahowanych z elementów gumowych, a także od pozostałości buforów po etapie upłynniania próbki. Z tego względu należy stosować wyłącznie sprzęt, materiały zużywalne i odczynniki wskazane w sekcjach 2.3 i 3.

8.5 Czynniki wpływające na parametry analityczne

Parametry analityczne zestawu *M-Typer Reagent Kit* są zależne od:

- rodzaju i jakości materiału klinicznego
- prawidłowości przeprowadzenia procedury izolacji kwasów mikolowych
- parametrów technicznych i sprawności systemu *FIA-MS/MS*
- stosowania zatwierdzonego oprogramowania do analizy danych

Nieprzestrzeganie instrukcji użytkowania zestawu może mieć negatywny wpływ na przebieg oraz wyniki izolacji kwasów mikolowych i interpretację wyników badania.

9 Ograniczenia zestawu

9.1 Ograniczenia analityczne

- Zestaw jest przeznaczony wyłącznie do izolacji kwasów mikolowych z materiału badanego. Ze względu na potencjalną heterogenność i różnorodność próbek producent nie określa parametrów odzysku dla poszczególnych rodzajów materiału klinicznego.
- W przypadku obecności więcej niż jednego gatunku lub szczepu prątków z rodzaju *Mycobacterium* w próbce badanej uzyskany profil kwasów mikolowych będzie odzwierciedlał wartości uśrednione, proporcjonalne do ilościowego udziału poszczególnych gatunków. Może to prowadzić do trudności interpretacyjnych — patrz sekcja 7.3.
- Nieprzestrzeganie instrukcji użytkowania zestawu może mieć negatywny wpływ na przebieg i wydajność izolacji kwasów mikolowych oraz na wiarygodność wyników analizy *FIA-MS/MS*.

9.2 Ograniczenia kliniczne

- Wynik badania nie stanowi samodzielnej podstawy rozpoznania klinicznego i musi być interpretowany łącznie z innymi wynikami badań laboratoryjnych oraz obrazem klinicznym pacjenta.
- Zestaw nie jest przeznaczony do stosowania jako jedyne narzędzie diagnostyczne w kierunku gruźlicy lub innych mikobakterioz — stanowi narzędzie wspomagające diagnostykę, nie zastępując hodowli bakteryjnej ani innych standardowych metod identyfikacji prątków.
- Metoda *FIA-MS/MS* z użyciem zestawu ***M-Typer Reagent Kit*** nie umożliwia oceny lekowrażliwości prątków.

9.3 Ograniczenia techniczne

- Wyniki analizy są zależne od sprawności technicznej systemu *FIA-MS/MS* — w tym od kalibracji spektrometru mas, czystości faz ruchomych oraz stanu technicznego autosamplera i kapilary PEEK.
- Stosowanie sprzętu analitycznego innego niż rekomendowany przez producenta (sekcja 3.2) może wymagać dodatkowej optymalizacji parametrów i może wpływać na parametry analityczne zestawu.
- Interpretacja wyników wymaga zastosowania dedykowanego oprogramowania ***M-Typer Software*** (patrz sekcja 7.1).

9.4 Warunki przechowywania i transportu wpływające na wyniki

- Stosowanie odczynników po upływie terminu ważności podanego na etykiecie jest niedopuszczalne i może

przewodzą do fałszywych lub nierzetelnych wyników.

- Nieprzestrzeganie zalecanych warunków przechowywania lub transportu (sekcja 2.6) może spowodować degradację odczynników i obniżenie wydajności izolacji.
- Po pierwszym otwarciu odczynniki należy zużyć w terminie podanym w sekcji 2.2. Przekroczenie tego terminu może wpłynąć na jakość izolacji i wiarygodność wyników.

10 Literatura

Poniższe publikacje stanowią podstawę naukową metody oraz były wykorzystane przy opracowaniu zestawu

M-Typer Reagent Kit.

1. Konrad Kowalski et al., Kwasy mikołowe – rola biologiczna i potencjalne zastosowanie w wykrywaniu oraz różnicowaniu rodzaju *Mycobacterium*, „*Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*”, 68, 2014, s. 350–358,
2. Konrad Kowalski et al. Kwasy mikołowe – potencjalne markery diagnostyki oportunistycznych zakażeń mikroorganizmami z podrzędu *Corynebacterineae*, „*Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*”, 66, 2012, s. 461–468
3. Rafał, S., Magdalena, D., Karol, M. et al. Detection and accurate identification of *Mycobacterium* species by flow injection tandem mass spectrometry (FIA-MS/MS) analysis of mycolic acids. *Sci Rep* 15, 13118 (2025). <https://doi.org/10.1038/s41598-025-96867-x>
4. Głogowska A, Majewski K, Szulc B, Kowalski K, Augustynowicz-Kopeć E. Rapid clinical detection of mycobacterial infections using M-Typer and flow-injection tandem mass spectrometry. *IJTLD Open*. 2025 Dec 10;2(12):751-756. doi: 10.5588/ijtldopen.25.0323. PMID: 41395324; PMCID: PMC12699965.

11 Substancje niebezpieczne

Podczas pracy z odczynnikami wchodzącymi w skład zestawu **M-Typer Reagent Kit** należy zwrócić szczególną uwagę na poniższe zagrożenia i stosować odpowiednie środki ostrożności. Szczegółowe informacje dotyczące każdego odczynnika znajdują się w kartach charakterystyki (SDS/MSDS) dostępnych na stronie internetowej producenta www.dimedical.pl/.....

MT-001 — Odczynnik do płukania

Parametr	Zagrożenia	
 	H225	Wysoce łatwopalna ciecz i pary.
	H319	Działa drażniąco na oczy.
	H336	Może wywoływać uczucie senności lub zawroty głowy.
	Środki ostrożności	
	P210	Przechowywać z dala od źródeł ciepła, gorących powierzchni, źródeł iskrzenia, otwartego ognia i innych źródeł zapłonu. Nie palić.
	P233	Przechowywać pojemnik szczelnie zamknięty.
	P280	Stosować ochronę oczu.
	P337 + P313	W przypadku utrzymywania się działania drażniącego na oczy: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.
	P370 + P378	W przypadku pożaru: Użyć gaśnicę proszkową/piasek/dwutlenek węgla do gaszenia.
	P403 + P235	Przechowywać w dobrze wentylowanym miejscu. Przechowywać w chłodnym miejscu.

MT-002 — Odczynnik do hydrolizy

Parametr	Zagrożenia	
  	H314	Powoduje poważne oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu.
	H370	Powoduje uszkodzenia narządów.
	H301 + H311 + H331	Działa toksycznie po połknięciu, w kontakcie ze skórą lub w następstwie wdychania.
	Środki ostrożności	
	P260	Nie wdychać pyłu/dymu/gazu/mgły/par/rozpylonej cieczy.
	P280	Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy.
	P301 + P330 + P331	W PRZYPADKU POŁKNIECIA: wypłukać usta. NIE wywoływać wymiotów.
	P303 + P361 + P353	W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ (lub z włosami): Natychmiast zdjąć całą zanieczyszczoną odzież. Spłukać skórę pod strumieniem wody.
	P305 + P351 + P338	W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.
	P310	Natychmiast skontaktować się z lekarzem.

MT-003 — Odczynnik do neutralizacji

Parametr	Zagrożenia	
	H315	Działa drażniąco na skórę.
	H319	Działa drażniąco na oczy.
	H335	Może powodować podrażnienia dróg oddechowych.
	Środki ostrożności	
	P261	Unikać wdychania mgły/par/rozpylonej cieczy.
	P264	Dokładnie umyć ręce i dotknięte części ciała po użyciu.
	P280	Stosować rękawice ochronne.
	P312	W przypadku złego samopoczucia skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ.
	P321	Zastosować określone leczenie (dodatkowa instrukcja w zakresie pierwszej pomocy na etykiecie)
	P337 + P313	W przypadku utrzymywania się działania drażniącego na oczy: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.

MT-004 — Odczynnik do ekstrakcji

Parametr	Zagrożenia	
 	H302	Działa szkodliwie po połknięciu.
	H315	Działa drażniąco na skórę.
	H319	Działa drażniąco na oczy.
	H331	Działa toksycznie w następstwie wdychania.
	H351	Podejrzewa się, że powoduje raka.
	H361d	Podejrzewa się, że działa szkodliwie na dziecko w łonie matki.
	H372	Powoduje uszkodzenie narządów poprzez długotrwałe lub powtarzane narażenie.
	Środki ostrożności	
	P260	Nie wdychać par.
	P264	Dokładnie umyć ręce i dotknięte części ciała po użyciu.
	P280	Stosować rękawice ochronne.
	P304+P340	W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO DRÓG ODDECHOWYCH: wprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić mu warunki do swobodnego oddychania.
	P311	Skontaktować się z lekarzem.
	P403 + P233	Przechowywać w dobrze wentylowanym miejscu. Przechowywać pojemnik szczelnie zamknięty.

MT-005 — Odczynnik do rozcieńczeń

Parametr	Zagrożenia	
  	H225	Wysoce łatwopalna ciecz i pary.
	H370	Powoduje uszkodzenie narządów.
	H301 + H311 + H331	Działa toksycznie po połknięciu, w kontakcie ze skórą lub w następstwie wdychania.
	Środki ostrożności	
	P210	Przechowywać z dala od źródeł ciepła, gorących powierzchni, źródeł iskrzenia, otwartego ognia i innych źródeł zapłonu. Nie palić.
	P280	Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną.
	P301+P310	W PRZYPADKU POŁKNIECIA: Natychmiast skontaktować się z lekarzem.
	P304+P340	W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO DRÓG ODDECHOWYCH: wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić mu warunki do swobodnego oddychania.
	P308+P311	W przypadku narażenia lub styczności: Skontaktować się z lekarzem.
	P311	Skontaktować się z lekarzem.
	P403 + P235	Przechowywać w dobrze wentylowanym miejscu. Przechowywać w chłodnym miejscu.

Sekcja A: Dane producenta

Producent



Centrum Medycyny Klinicznej DiMedical Sp. z o.o.
ul. Żeromskiego 52
90-626 Łódź, Polska

Telefon: (+48) 502 660 480

E-mail: kontakt@dimedical.pl

Strona internetowa: www.dimedical.pl

Informacja dodatkowa

Producent posiada certyfikowany system zarządzania jakością zgodny z normą **ISO 13485**.

Identyfikacja wyrobu

Element	Treść
Nazwa wyrobu	M-Typer Reagent Kit (Set 1 + Set 2)
Numer katalogowy zestawu	MT-KIT-001
Numer katalogowy Set 1	MT-KIT-SET1
Numer katalogowy Set 2	MT-KIT-SET2
Numer serii / partii	Podany na etykiecie opakowania
Data ważności	Podana na etykiecie opakowania
Numer wersji IFU	IFU-M-TYPER-001-v1.0
Data wydania IFU	[do uzupełnienia po zatwierdzeniu]
Klasyfikacja wyrobu	Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro (IVD)
Klasa wyrobu IVDR	C

Sekcja B: Zgłaszanie poważnych incydentów

Poważny incydent to zdarzenie związane z użyciem wyrobu medycznego, które doprowadziło lub mogło doprowadzić do:

- śmierci pacjenta, użytkownika lub innej osoby,
- poważnego pogorszenia stanu zdrowia pacjenta, użytkownika lub innej osoby,
- poważnego zagrożenia zdrowia publicznego.

W przypadku stwierdzenia lub podejrzenia poważnego incydentu związanego z zestawem **M-Typer Reagent Kit** należy niezwłocznie zgłosić to zdarzenie producentowi oraz właściwemu organowi krajowemu.

Producent:

Centrum Medycyny Klinicznej DiMedical Sp. z o.o.

ul. Żeromskiego 52, 90-626 Łódź, Polska

tel. +48 502 660 480

e-mail: kontakt@dimedical.pl

www.dimedical.pl

Właściwy organ w Polsce:

Prezes Urzędu Rejestracji Produktów Leczniczych,
Wyrobu Medycznych i Produktów Biobójczych (URPL)
Al. Jerozolimskie 181C, 02-222 Warszawa
tel. +48 22 492 11 00
www.gov.pl/web/urpl

W przypadku podjęcia przez producenta zewnętrznych działań korygujących dotyczących bezpieczeństwa (FSCA), użytkownicy wyrobu zostaną poinformowani za pośrednictwem notatki bezpieczeństwa (FSN).

Sekcja C: Objasnienie symboli

Poniższe symbole mogą występować na opakowaniu, etykiecie lub w niniejszej instrukcji używania zestawu *M-Typer Reagent Kit*.

Symbol	Znaczenie
	Producent
	Kraj produkcji
	Data produkcji
	Używać przed (data ważności)
	Numer serii / partii
	Numer katalogowy
	Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro
	Zawartość wystarcza na 100 testów
	Ograniczenie temperatury przechowywania
	Chronić przed światłem
	Zawiera substancje niebezpieczne (substancje rakotwórcze, mutagenne lub działające szkodliwie na rozrodczość - CMR)
	Nie używać, jeśli opakowanie jest uszkodzone, i zapoznać się z instrukcją używania
	Przystroga
	Należy zapoznać się z instrukcją używania
	Niepowtarzalny identyfikator wyrobu (UDI)
	Oznakowanie zgodności CE

Table of contents

1	Introduction	31
1.1	Intended use	31
1.2	Principle of the method	32
2	Kit components	32
2.1	Safety information	32
2.2	Kit components	33
2.3	Additional reagents (not included in the kit)	33
2.4	Quality control	34
2.5	Disposal of laboratory waste	34
2.6	Transport conditions	35
3	Necessary equipment	35
3.1	Auxiliary equipment	35
3.2	Recommended analytical equipment	35
4	Preparation of the measurement system	36
4.1	Preparation of the liquid chromatograph	36
4.2	Autosampler preparation	36
4.3	Mass spectrometer preparation	36
4.4	Verification of the integrated FIA-MS/MS system	39
5	Sample preparation for analysis	41
5.1	Characterization of the test material	41
5.2	Sample preparation	41
5.2.1	Sputum liquefaction	41
5.2.2	Mycolic acid isolation	41
5.2.3	Optional concentration and reconstitution step	42
5.3	Storage of the prepared sample	43
6	Sample analysis	43
6.1	Autosampler parameters	43
6.2	Liquid chromatograph program	43
6.3	Data acquisition parameters	43
6.4	Analytical sequence — recommended injection order	44
6.5	Management of abnormal signals during an analytical run	44
7	Interpretation of results	44
7.1	Principle of interpretation	44
7.2	Criteria for positive and negative results	45
7.3	Mixed samples	45
7.4	Interpretive limitations	46
8	Performance characteristics	46
8.1	Diagnostic sensitivity	46
8.2	Diagnostic specificity	46
8.3	Limit of detection	47
8.4	Other analytical parameters	47
8.5	Factors affecting analytical parameters	47
9	Limitations of the kit	47
9.1	Analytical limitations	47
9.2	Clinical limitations	48
9.3	Technical limitations	48
9.4	Storage and transport conditions affecting results	48
10	Literature	49
11	Hazardous substances	50
	Section A: Manufacturer Data	52
	Section B: Reporting of Serious Incidents	52
	Section C: Explanation of Symbols	53

1 Introduction

Mycolic acids are one of the basic structural elements of the cell wall of bacteria belonging to the suborder *Corynebacterineae*. These compounds are long-chain α -hydroxy- β -alkyl fatty acids containing two hydrocarbon chains: a longer meromycolic chain (**R₁**) and a shorter α -carbon chain. *Mycobacteria* are characterized by the presence of mycolic acids with a length of 60–90 carbon atoms while containing a fully saturated α -alkyl chain (**R₂**) with a well-defined length of 22, 24 or 26 carbon atoms.

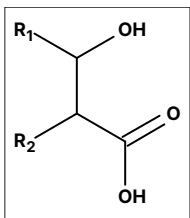


Fig. 1. Structure of α -hydroxy- β -alkyl fatty acids.

Careful structural analyses have shown that *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* are characterized by a definite dominance of mycolic acids with an α -alkyl chain length equal to 26 carbon atoms regardless of their type. By contrast, atypical mycobacteria are characterized by a predominance of mycolic acids with shorter alpha chains.

As early as the 1980s, researchers turned their attention to mycolic acids as potential markers for detection and differentiation of mycobacteria. These compounds are an integral part of the cell wall of mycobacteria, making up 20–40% of their dry weight. In addition, they are compounds with good chemical stability and can be detected both from material containing live mycobacteria and only their cellular sheaths or biofilm elements.

Published studies confirm the utility of mycolic acid analysis by tandem mass spectrometry in the diagnosis of tuberculosis and mycobacterioses caused by atypical mycobacteria.

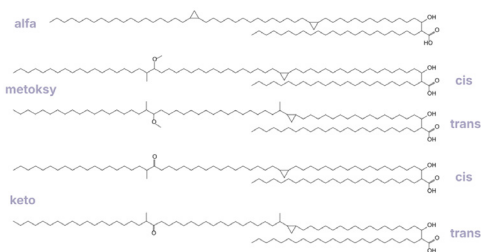


Fig. 2. Types of mycolic acids.

1.1 Intended use

The ***M-Typer Reagent Kit*** is an in vitro diagnostic medical device (IVD) intended for the isolation of mycolic acids from biological material — including, but not limited to, sputum — for subsequent analysis by flow injection analysis coupled to tandem mass spectrometry (*FIA-MS/MS*). This method can serve as a supporting tool in the diagnosis of diseases caused by mycobacteria of the *Mycobacterium* genus.

Intended user: Qualified laboratory personnel in diagnostic laboratories, with practical knowledge of tandem mass spectrometer operation and MS/MS data analysis software.

Important: The test result does not constitute a standalone basis for clinical diagnosis. It should be interpreted in conjunction with other laboratory test results and the patient's clinical presentation.

1.2 Principle of the method

The ***M-Typer Reagent Kit*** is used to isolate mycolic acids from the test material. Isolation is carried out by sequentially washing off free lipids, alkaline hydrolysis, neutralization, and then liquid-liquid extraction. The obtained extract may be analyzed directly by FIA-MS/MS or stored for later analysis.

FIA-MS/MS (*flow injection analysis tandem mass spectrometry*) is based on direct injection of the sample into the chromatographic system without chromatographic separation, electrospray ionization (ESI) in negative mode, and detection by multiple reaction monitoring (MRM). Each MRM transition corresponds to a unique mycolic acid structure and enables profiling of the mycolic acid composition characteristic of a given *Mycobacterium* species.

2 Kit components

2.1 Safety information

The components of the kit contain hazardous substances. Before use, read the safety data sheets (SDS/MSDS) to assess the hazards associated with the reagents. Detailed information on each reagent can be found in the safety data sheets (SDS/MSDS) available on the manufacturer's website: www.dimedical.pl/.....

▲ SPECIAL HEALTH HAZARD WARNING (CMR): The extraction reagent (MT-004) contains substances suspected of causing cancer (H351) and suspected of damaging the unborn child (H361d). This reagent must be handled with special care. Inhalation of vapors and skin contact must be strictly avoided.

When working with the reagents, the following personal protective equipment must be used:

- disposable gloves (nitrile recommended),
- laboratory coat,
- safety glasses.

All work with reagents must be carried out under a chemical fume hood. Due to the different chemical properties of the components, the kit is supplied in two separate packages: **Set 1** and **Set 2**.

A detailed list of hazard and precautionary statements (GHS/CLP) for individual reagents is provided in the Appendix at the end of these instructions.

2.2 Kit components

All components should be stored in accordance with the conditions stated below and on the label of each reagent.

Table 1A. Kit components — Set 1.

Catalog No.	Description	Active components / Composition	Storage	Stability after opening
MT-001	Wash reagent	Main component: isopropanol. Chemical class: aliphatic alcohol. Function: washing off free lipids.	2–25°C	30 days at 2–8°C
MT-002	Hydrolysis reagent	Main component: alkaline solution of potassium hydroxide in alcohol. Chemical class: strong inorganic base in an alcoholic mixture. Function: alkaline hydrolysis of the material.	2–25°C	30 days at 2–8°C
MT-004	Extraction reagent	Main component: chloroform. Chemical class: chlorinated organic solvent. Function: liquid-liquid extraction of mycolic acids.	2–25°C	30 days at 2–8°C
MT-005	Dilution reagent	Main component: alcoholic mixture with ammonium fluoride. Chemical class: alcoholic mixture with an inorganic salt additive. Function: dilution and preparation of the extract for FIA-MS/MS analysis.	2–25°C	30 days at 2–8°C

Table 1B. List of kit components — Set 2.

Catalog No.	Description	Active components / Composition	Storage	Stability after opening
MT-003	Neutralization reagent	Main component: hydrochloric acid solution. Chemical class: inorganic acid. Function: neutralization after the hydrolysis step.	2–25°C	30 days at 2–8°C

One complete *M-Typer Reagent Kit (Set 1 + Set 2)* is intended for 100 mycolic acid isolation analyses.

The neutralization reagent (**MT-003**) is supplied in a separate package (**Set 2**) due to transport safety requirements applicable to reagents with different chemical properties. Both packages together constitute the complete kit required to perform the mycolic acid isolation procedure.

Shelf life of unopened reagents:

Unopened reagents included in the *M-Typer Reagent Kit (Set 1 and Set 2)*, when stored at 2–25°C, remain stable for 12 months from the date of manufacture.

After first opening, the reagent **must be stored at 2–8°C, kept tightly closed after each use, and used within 30 days of first opening.**

Note: Do not freeze the kit or any of its components!

2.3 Additional reagents (not included in the kit)

The following additional reagents, not supplied in the kit, are required to perform *FIA-MS/MS* measurements:

- *methanol*, of at least LC-MS/MS quality (Mobile Phase

A — MPA)

- *chloroform* stabilized with ethanol, of at least LC-MS/MS quality (Mobile Phase B — MPB and wash solvent)
- *2-propanol*, of at least LC-MS/MS quality
- 1% *N-acetyl-cysteine* in 4% *sodium hydroxide*
- sterile 0.067 mol/l phosphate buffer, pH 6.8
- 5% Tween 80 solution.

In addition, the following critical-use consumables are required:

- chromatography vials with caps and uncut Teflon septa (1.5 mL / 2 mL),
- 50 mL Falcon tubes for hydrolysis and extraction, suitable for incubation at 90°C.

2.4 Quality control

Manufacturer quality control: each kit batch is tested by the manufacturer for compliance with the quality specification before release for use.

User quality control — during routine use of the kit in the laboratory, it is recommended to:

- perform blank sample analysis at least once for every 10 analyses of real samples,
- periodically analyze a reference mycolic acid solution to verify proper performance of the *FIA-MS/MS* system,
- monitor the chromatographic signal shape and the signal-to-noise ratio.

A correct analytical signal should appear within the range of 0.05–0.30 min and should be characterized by a *hump-shaped* profile, as described in section 4.4.

If a signal is detected in the blank sample or if the signal shape is disturbed:

1. check the purity of the mobile phases,
2. flush the chromatographic system,
3. repeat the analysis.

2.5 Disposal of laboratory waste

All waste, including sealed bottles of expired reagents, is classified as chemical, hazardous waste (code 18 01 06*). Unopened packaging should be discarded in its entirety; solutions should be collected in tightly closed glass containers and submitted for disposal.

Detailed information on the disposal of individual reagents can be found in Section 13 of the corresponding *SDS/MSDS* sheets.

Test material used for analysis — regardless of its characteristics — should be considered potentially infectious and disposed of in accordance with local regulations on medical waste (code 18 01 03*).

2.6 Transport conditions

The kit should be transported at 2–25°C. Short-term temperature deviations during transport should not exceed the range of 2–30°C. Due to the chemical properties of the reagents, the ***M-Typer Reagent Kit*** is transported in two separate packages: **Set 1** and **Set 2**. Protect from light and mechanical damage.

3 Necessary equipment

3.1 Auxiliary equipment

In order to use the ***M-Typer Reagent Kit*** for the isolation of mycolic acids from biological material, the following laboratory equipment is required:

Equipment	Specification
Laboratory centrifuge	Equipped with a rotor for 50 mL tubes; minimum speed 4500 rpm. A refrigerated centrifuge (4°C) is recommended; operation at room temperature is permitted.
Vortex mixer	Standard
Horizontal laboratory shaker	For 30-minute incubation at room temperature
Heating block or water bath	Capable of incubating tubes at 90°C
Automatic pipette	Range: 100–1000 µL

3.2 Recommended analytical equipment

For *FIA-MS/MS* analysis of isolated mycolic acids, the manufacturer recommends the following analytical system:

System component	Specification
HPLC analytical pumps	Binary pump set
Autosampler	Suitable for 1.5 mL / 2 mL vials with uncut Teflon septa; injection range 1–50 µL
Tandem mass spectrometer	Type: triple quadrupole (QqQ) with ESI ion source, operating in negative ionization mode, capable of <i>FIA-MS/MS</i> analysis with MRM transition monitoring. Minimum requirements: ion detection sensitivity no lower than reference platforms (<i>Sciex QTRAP® 6500</i> , <i>Shimadzu LCMS-8050</i>). Example platforms: <i>QTRAP® 6500</i> (<i>Sciex</i>), <i>LCMS-8050</i> (<i>Shimadzu</i>) or an equivalent system meeting the above criteria.
Connecting capillary	PEEK, length 50 cm, internal diameter 100 µm

4 Preparation of the measurement system

4.1 Preparation of the liquid chromatograph

This procedure is designed for medium- and high-pressure liquid chromatographs equipped with a set of two binary pumps.

The liquid chromatograph must be prepared before analysis as follows:

1. If the chromatograph has previously worked with mobile phases other than those used in the present analysis — flush (purge) the channels of both binary pumps, first with Mobile Phase A (MPA) only.
2. After flushing with pump A — connect Mobile Phase B (MPB) to channel B and perform a purge of channel B.
3. If the chromatograph has previously worked with mobile phases according to this procedure — connect MPA and MPB directly to the respective pumps and proceed to step 4.
4. Recommended compressibility settings: pump A — 1.25 GPa; pump B — 1.60 GPa (if the chromatograph software allows).

Note: The analysis is carried out under absolutely anhydrous conditions. Prior to analysis, residual water must be removed from all components of the chromatographic system. Mobile Phase A or 2-propanol (of at least *LC-MS/MS* grade) may be used for this purpose.

4.2 Autosampler preparation

This procedure is for autosamplers allowing washing with at least one wash solution and performing injections in the range of 1–50 μL from 1.5 mL / 2 mL vials with uncut Teflon septa.

1. If the autosampler has previously worked with rinsing solutions other than those used in the present analysis — rinse (purge) it first with Mobile Phase A (MPA) only.
2. After flushing — connect the Wash Solvent and perform a purge.
3. Connect the autosampler directly to the pump and to the mass spectrometer using a PEEK capillary (50 cm / 100 μm i.d.).

Note: Deviations from the recommended capillary specification may result in differences in signal shape or shifts in the appearance times of analytical signals.

4.3 Mass spectrometer preparation

This procedure is designed for triple quadrupole (QqQ) tandem mass spectrometers equipped with an electrospray (ESI) ion source. Due to the sensitivity of the method, it is recommended to use the most sensitive instruments

available.

Prior to analysis, the detection parameters of the mass spectrometer must be optimized. The recommended parameters for the *QTRAP® 6500 (Sciex)* and *LCMS-8050 (Shimadzu)* instruments are given below. For accurate optimization of ion detection parameters, it is recommended to use a commercially available mixture of mycolic acids (e.g. Mycolic acid from *Mycobacterium tuberculosis* (bovine strain) (Product Specification [37281-34-8], Arctomsci).

Table 2A. Ion source parameters — Sciex QTRAP® 6500.

Parameter	Value
Curtain gas (CUR)	20 psi
Temperature of the ion source (TEMP)	450°C
Nebulizing gas (GS1)	50 psi
Drying gas (GS2)	70 psi
Ionization	Negative (NEG)
Voltage at the electrode (IS)	-4500 V

Table 2B. Ion source parameters — Shimadzu LCMS-8050.

Parameter	Value
Interface temperature	350°C
Ion source temperature (desolvation)	600°C
DL temperature	250°C
Nebulizing gas flow	3 L/min
Heating gas flow	10 L/min
Drying gas flow	10 L/min
Ionization mode	Negative (NEG)
Q1 resolution	Low
Q3 resolution	Unit

Table 3A. Ion transmission parameters (MRM transitions) — Sciex QTRAP® 6500.

Q1 mass [m/z]	Q3 mass [m/z]	Declustering potential [V]	Collision energy [V]
885.9	339.4	-150	-60
913.9	367.4	-150	-62
914	339.4	-150	-60
915.9	367.4	-150	-68
929.9	367.4	-150	-69
942	395.4	-150	-65
942.1	367.4	-150	-64
943.9	367.4	-150	-68
957.9	367.4	-150	-69
958	339.4	-150	-73
970	367.4	-150	-73
970	395.4	-150	-67
971.9	367.4	-150	-73
985.9	367.4	-150	-73
998	395.4	-150	-68

Q1 mass [m/z]	Q3 mass [m/z]	Declustering potential [V]	Collision energy [V]
1000	395.4	-150	-75
1014	367.4	-150	-77
1024.1	367.4	-150	-70
1028.1	395.4	-150	-77
1038.1	395.4	-150	-72
1052.1	339.4	-150	-70
1052.1	367.4	-150	-70
1080.1	367.4	-150	-74
1096.1	367.4	-150	-72
1108.1	367.4	-150	-72
1122.2	367.4	-150	-74
1124.1	395.4	-150	-74
1136.1	367.4	-150	-74
1136.2	339.4	-150	-74
1136.2	395.4	-150	-74
1150.2	367.4	-150	-74
1152.2	367.4	-150	-74
1164.2	367.4	-150	-74
1164.2	395.4	-150	-74
1166.2	367.4	-150	-74
1178.2	367.4	-150	-74
1180.2	367.4	-150	-74
1180.2	395.4	-150	-74
1192.2	367.4	-150	-74
1192.2	395.4	-150	-74
1194.2	339.4	-150	-74
1194.2	367.4	-150	-74
1196.2	395.4	-150	-74
1220.2	395.4	-150	-74
1222.2	367.4	-150	-74
1222.2	395.4	-150	-74
1250.2	367.4	-150	-74
1250.2	395.4	-150	-74
1252.2	395.4	-150	-74
1264.3	395.4	-150	-74
1280.2	395.4	-150	-74
1294.3	395.4	-150	-74

Table 3B. Ion transmission parameters (MRM transitions) — Shimadzu LCMS-8050.

Q1 mass [m/z]	Q3 mass [m/z]	Dwell time [msec]	Q1 pre bias [V]	Collision energy [V]	Q3 pre bias [V]
885.9	339.4	6	30	62	20
913.9	367.4	6	30	62	20
914	339.4	6	30	62	20
915.9	367.4	6	30	62	20
929.9	367.4	6	30	62	20
942	395.4	6	30	62	20
942.1	367.4	6	30	62	20
943.9	367.4	6	30	62	20
957.9	367.4	6	30	62	20
958	339.4	6	30	62	20
970	367.4	6	30	62	20
970	395.4	6	30	62	20
971.9	367.4	6	30	62	20
985.9	367.4	6	30	62	20
998	395.4	6	30	62	20
1000	395.4	6	30	62	20
1014	367.4	6	30	62	20
1024.1	367.4	6	30	62	20
1028.1	395.4	6	30	62	20

Q1 mass [m/z]	Q3 mass [m/z]	Dwell time [msec]	Q1 pre bias [V]	Collision energy [V]	Q3 pre bias [V]
1038.1	395.4	6	30	62	20
1052.1	339.4	6	30	62	20
1052.1	367.4	6	30	62	20
1080.1	367.4	6	30	62	20
1096.1	367.4	6	30	62	20
1108.1	367.4	6	30	62	20
1122.2	367.4	6	30	62	20
1124.1	395.4	6	30	62	20
1136.1	367.4	6	30	62	20
1136.2	339.4	6	30	62	20
1136.2	395.4	6	30	62	20
1150.2	367.4	6	30	62	20
1152.2	367.4	6	30	62	20
1164.2	367.4	6	30	62	20
1164.2	395.4	6	30	62	20
1166.2	367.4	6	30	62	20
1178.2	367.4	6	30	62	20
1180.2	367.4	6	30	62	20
1180.2	395.4	6	30	62	20
1192.2	367.4	6	30	62	20
1192.2	395.4	6	30	62	20
1194.2	339.4	6	30	62	20
1194.2	367.4	6	30	62	20
1196.2	395.4	6	30	62	20
1220.2	395.4	6	30	62	20
1222.2	367.4	6	30	62	20
1222.2	395.4	6	30	62	20
1250.2	367.4	6	30	62	20
1250.2	395.4	6	30	62	20
1252.2	395.4	6	30	62	20
1264.3	395.4	6	30	62	20
1280.2	395.4	6	30	62	20
1294.3	395.4	6	30	62	20

4.4 Verification of the integrated FIA-MS/MS system

After preparing and optimizing the parameters of the FIA-MS/MS system according to the instructions in sections 4.1–4.3, the correct operation of the system must be verified by performing *FIA-MS/MS* analysis of a solution of commercially available mycolic acids diluted in **MT-004** reagent. The analysis should be carried out in the same manner as the analysis of the test sample.

The signal from the tested substances, forming a so-called *hump shape*, should appear on the chromatogram no earlier than 0.05 min. The total duration of the signal, measured from its appearance to return to baseline, should not exceed 0.30 min. The shape of the signal should be characterized by a steep rise and fall, between which the signal remains at a relatively constant level (plateau). The plateau region should be described by at least 10 measurement points.

Deviations from the expected signal shape may result from differences in the dead volumes of the *FIA-MS/MS* system. They can be corrected by injection parameters (volume and injection rate) and the length and/or diameter of the PEEK capillary connecting the autosampler to the mass

spectrometer.

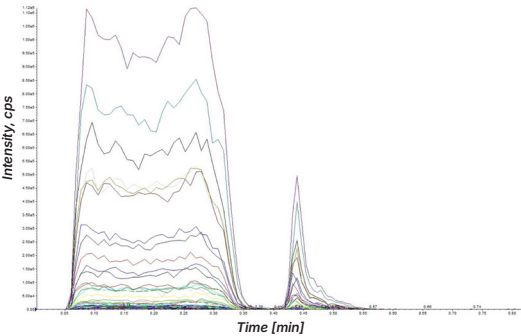


Fig. 3. Example FIA-MS/MS chromatogram showing a positive result.

Note: An additional smaller signal visible on the chromatogram after the main peak has no diagnostic significance. It is a technical artifact related to the FIA-MS/MS analysis process and the characteristics of the measurement system. Only the main analytical signal should be considered when assessing signal acceptability and interpreting the result.

5 Sample preparation for analysis

5.1 Characterization of the test material

The test material for the isolation of mycolic acids can be any material potentially containing mycobacteria of the *Mycobacterium* genus, fragments of their cell walls, or biofilm elements.

Recommended types of test material:

- sputum,
- bronchoalveolar lavage (BAL),
- cell sediment from bacterial cultures on solid or liquid media.

In justified laboratory cases, other materials may also be used, provided they have been previously validated by the laboratory..

5.2 Sample preparation

5.2.1 Sputum liquefaction

Sputum must be liquefied prior to mycolic acid isolation in accordance with the following procedure:

1. Measure **2 mL** of sputum and transfer to a 50 mL Falcon tube.
2. Add an equal volume (**2 mL**) of 1% N-acetylcysteine in 4% sodium hydroxide solution.
3. Incubate at room temperature for **20 minutes** with occasional mixing.
4. After incubation, bring the sample volume to approximately **50 mL** with sterile 0.067 mol/l phosphate buffer (pH 6.8) and add **1–2 drops** of 5% Tween 80 solution.
5. Close the tube and mix the contents by inverting several times.
6. Centrifuge at **4°C** for **20 minutes** at 4500 rpm.
7. Discard the supernatant. Subject the obtained cell pellet to further processing in accordance with section 5.2.2.

5.2.2 Mycolic acid isolation

The following procedure applies to the cell pellet obtained after sputum liquefaction (section 5.2.1) or to cell pellets obtained from other test materials.

The procedure must be carried out in the same 50 mL Falcon tube in which the cell pellet was obtained after centrifugation.

Note: The liquefaction procedure using N-acetylcysteine (section 5.2.1) applies exclusively to sputum. For material from bacterial cultures and other materials from which a cell pellet has been obtained, the mycolic acid isolation procedure must be carried out directly from the cell pellet.

Step	Action
1	Add 2 mL of wash reagent (MT-001). Vortex for 30 seconds, then centrifuge at room temperature or 4°C for 20 minutes at 4500 rpm. Discard the supernatant.
2	Add 2 mL of hydrolysis reagent (MT-002) to the washed pellet. Tightly close the tube and incubate at 90°C for 60 minutes.
3	After cooling to room temperature, add 2 mL of neutralization reagent (MT-003, Set 2). Note: a precipitate will form from the solution — this is normal.
4	Add 2 mL of extraction reagent (MT-004).
5	Perform extraction for 30 min on a horizontal shaker.
6	After phase separation, transfer the entire lower chloroform layer to a 1.5 mL autosampler vial. The volume of the transferred phase is usually approximately 1.5 mL . Note: only the lower layer should be collected for further steps. Collection of material from the upper layer may adversely affect the quality of the analytical signal. At this stage, the sample may be temporarily stored prior to further preparation for analysis, in accordance with the storage conditions specified in the instructions.
7	From the autosampler vial containing the transferred lower phase, pipette 250 µl of the sample and transfer to a new chromatographic vial. Then add 250 µl of the dilution reagent (MT-005).
8	Vortex for 30 s. The sample is ready for FIA-MS/MS analysis.

5.2.3 Optional concentration and reconstitution step

For materials with an expected low mycolic acid content, particularly paucibacillary materials such as cerebrospinal fluid, urine or other extrapulmonary materials, an additional extract concentration step may be applied after completion of mycolic acid isolation.

This step involves partial or complete evaporation of the lower chloroform phase containing the isolated mycolic acids, previously transferred to the autosampler vial in accordance with step 6 of the standard procedure. Evaporation may be carried out under a nitrogen stream or under other controlled laboratory conditions ensuring safe removal of the solvent without degradation of the analytes. After solvent evaporation, a dry residue remains in the vial. Prior to **FIA-MS/MS** analysis, the residue must be reconstituted by adding to the vial:

250 µl of reagent MT-004 — extraction reagent

and

250 µl of reagent MT-005 — dilution reagent.

After adding the reagents, vortex the vial thoroughly to ensure complete reconstitution of the residue and obtain a homogeneous final sample. The sample prepared in this way is ready for **FIA-MS/MS** analysis.

The purpose of this procedure is to increase the concentration of analytes in the final sample intended for analysis, which may improve the detectability of analytical signals in materials with low biological load.

This step is optional and should be validated by the laboratory for the given type of clinical material.

5.3 Storage of the prepared sample

The prepared sample (vial with the post-extraction fraction) may be stored prior to analysis at approximately **-70°C** for a period not exceeding **one calendar year**. Before analysis, the sample must be removed from the freezer and allowed to reach room temperature.

6 Sample analysis

FIA-MS/MS sample analysis must be performed after preparation and verification of the measurement system in accordance with sections 4.1–4.4 and after sample preparation in accordance with section 5.

6.1 Autosampler parameters

Table 4. Injection parameters.

Parameter	Value
Injection volume	50 µL
Injection rate	10 µL/s
Autosampler temperature	8°C

Note: Autosampler temperature of **8°C** is a critical parameter for sample stability and correct analysis. Exceeding this value may adversely affect the quality of the analytical signal and the reliability of the result.

6.2 Liquid chromatograph program

Table 5. Gradient program.

Time [min]	Mobile Phase A [%]	Mobile Phase B [%]	Flow [mL/min]
0.00	40	60	0.25
0.39	40	60	0.25
0.40	0	100	1.00
0.90	0	100	1.00
1.00	40	60	1.00

Total analysis time per sample: **1 minute**.

Note: The flow rate change from 0.25 mL/min to 1.00 mL/min between 0.39 and 0.40 min is a critical method parameter and must not be altered.

6.3 Data acquisition parameters

The analysis must be performed in multiple reaction monitoring (MRM) mode, in accordance with the ion transmission parameters given in Tables 3A and 3B (section 4.3).

Data acquisition requires the manufacturer’s software specific to the mass spectrometer platform used (e.g.,

Analyst for Sciex systems or **LabSolutions** for Shimadzu systems). Other MRM data acquisition software is not provided for within the approved procedure.

For processing of the obtained results, chromatographic signal integration software capable of generating reports in **TXT** or **CSV** format may be used (e.g., **MultiQuant** for Sciex systems or equivalent solutions).

Interpretation of results is performed exclusively using the dedicated **M-Typer Software**.

6.4 Analytical sequence — recommended injection order

To ensure the reliability of results, the following injection sequence is recommended in the analytical run:

1. Blank — extraction reagent (**MT-004**) transferred to an appropriate chromatography vial — verification of analytical background cleanliness.
2. Reference mycolic acid solution — verification of **FIA-MS/MS** system performance (in accordance with section 4.4).
3. Test samples.
4. Blank — analyses of test samples must be interspersed with a blank at least once every 10 analyses of real samples.

6.5 Management of abnormal signals during an analytical run

If abnormalities are detected during an analytical run, the following corrective actions should be taken:

Observation	Action
Signal in blank sample	Check the purity of mobile phases → flush the system → repeat blank
Absent signal or signal below expectation	Check injection volume and rate → check MRM parameters → repeat system verification (section 4.4)
Distorted signal shape (no plateau)	Adjust injection parameters or PEEK capillary length/diameter (section 4.2)
Signal appears outside the 0.05–0.30 min window	Check mobile phase flow → verify gradient program (Table 5)

7 Interpretation of results

7.1 Principle of interpretation

The **M-Typer Reagent Kit** is used to isolate mycolic acids from biological material. Result interpretation is performed by comparing the mycolic acid profile of the test sample with the reference profile.

Each monitored MRM transition corresponds to a signal characteristic of specific mycolic acids associated with mycobacteria of the *Mycobacterium* genus. Averaged and

normalized measurement data (mycolic acid profile) of the test sample are compared with the reference profile using the dedicated **M-Typer Software**.

M-Typer Software is a separate in vitro diagnostic medical device (IVD) bearing its own CE marking. Detailed information on result interpretation, profile classification, and taxonomic differentiation is contained in the **M-Typer Software** Instructions for Use.

Differentiation of results at the appropriate taxonomic level, including the distinction of *Mycobacterium tuberculosis* from atypical mycobacteria, requires the use of **M-Typer Software** and does not constitute an independent function of the **M-Typer Reagent Kit**.

7.2 Criteria for positive and negative results

The result of FIA-MS/MS analysis is interpreted as follows:

- **Result indicating the presence of mycobacteria of the *Mycobacterium* genus**

Obtaining a hump-shaped signal described by at least 10 measurement points in the *plateau region*, with an intensity of at least 10 times the observed background noise ($S/N \geq 10$) for a given MRM transition, measured prior to signal appearance in the interval from 0.00 to 0.05 min. A positive result is confirmed by obtaining such a signal for at least 1 of the 52 monitored MRM transitions.

- **Equivocal / indeterminate result**

Obtaining a hump-shaped signal described by at least 10 measurement points in the *plateau region*, with an intensity greater than 3 times and less than 10 times the observed background noise ($3 \leq S/N < 10$) for a given MRM transition, measured prior to signal appearance in the interval from 0.00 to 0.05 min. An equivocal result is confirmed by obtaining such a signal for at least 1 of the 52 monitored MRM transitions.

- **Result indicating the absence of mycobacteria of the *Mycobacterium* genus**

Failure to obtain a signal meeting the above criteria for any of the 52 monitored MRM transitions, i.e. absence of a *hump-shaped* signal described by at least 10 measurement points in the plateau region with an intensity exceeding 3 times the observed background noise ($S/N < 3$).

Note: Final diagnostic interpretation of the obtained mycolic acid profile, including its classification and differentiation at the appropriate taxonomic level, requires the use of the dedicated **M-Typer Software**.

7.3 Mixed samples

In the case of the presence of more than one species or strain of mycobacteria of the *Mycobacterium* genus in the test sample, the obtained mycolic acid profile may reflect a mixed signal, proportional to the quantitative contribution of the individual components of the sample. This may directly

affect the final interpretation of the result and taxonomic differentiation, which should be performed using the dedicated ***M-Typer Software***.

7.4 Interpretive limitations

The result obtained using the ***M-Typer Reagent Kit***:

- **does not constitute a standalone basis for clinical diagnosis** — it should be interpreted in conjunction with other laboratory test results and the patient's clinical presentation,
- **does not replace** bacterial culture or other standard methods of mycobacterial identification,
- is dependent on the quality of the test material, the correctness of mycolic acid isolation, and the performance of the *FIA-MS/MS* system.

8 Performance characteristics

8.1 Diagnostic sensitivity

Diagnostic sensitivity was determined on the basis of a study comprising **199 clinical specimens** from the Regional Complex of Healthcare Facilities — Centre for Pulmonary Disease Treatment and Rehabilitation in Łódź. The test material included: **131 sputum samples, 45 bronchial aspirates, 15 pleural fluids, 1 fine-needle aspiration biopsy of the lung, 5 bronchial catheter fluids, and 1 urine sample.**

Based on the combined analysis of classical, genetic, and *LC-MS/MS* results, **36 positive samples** were identified, constituting the reference point for the assessment of diagnostic sensitivity. For *LC-MS/MS*, **33 positive results** were obtained, corresponding to a diagnostic sensitivity of **92%**.

8.2 Diagnostic specificity

Diagnostic specificity was determined on the basis of the analysis of:

- 94 sputum samples collected from healthy individuals
- 88 sputum samples collected from individuals with non-mycobacterial pneumonia
- 7 bacterial culture samples from organisms outside the *Mycobacterium* genus:
 - *Rhodococcus equi*
 - *Nocardia asteroides*
 - *Corynebacterium glutamicum*
 - *Dietzia maris*
 - *Gordonia bronchialis*
 - *Gordonia sputi*
 - *Tsukamurella paurometabola*

No false-positive result was found in any of the tested samples. Diagnostic specificity is **100%**.

8.3 Limit of detection

The limit of detection (**LOD**) of the method is defined as a signal meeting the criterion $S/N \geq 3$, while the limit of quantification (**LOQ**) is defined as a signal meeting the criterion $S/N \geq 6$. The analytical sensitivity of the method was determined at 5–50 CFU/mL.

For selected strains, the following example numerical values of LOD and LOQ were determined, expressed as the number of cells per sample:

Strain	LOD [cells/sample]	LOQ [cells/sample]
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6	16
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	2	10
<i>Mycobacterium abscessus</i>	4	13

8.4 Other analytical parameters

Parameter	Value
Recovery	96–104%
Method precision (LC-MS/MS)	1–3%
Repeatability of the procedure	2–5%
Reproducibility	8–16%

Note: A full quantitative characterization of analytical interferences was not the subject of a separate validation study. From analytical practice, it is known that potential interfering signals may originate from certain plasticizers or compounds extracted from rubber components, as well as from buffer residues after the sample liquefaction step. For this reason, only the equipment, consumables, and reagents specified in sections 2.3 and 3 must be used.

8.5 Factors affecting analytical parameters

The analytical parameters of the *M-Typer Reagent Kit* depend on:

- the type and quality of the clinical material
- the correctness of the mycolic acid isolation procedure
- the technical parameters and performance of the FIA-MS/MS system
- the use of approved data analysis software

Failure to follow the kit's instructions for use may adversely affect the course and results of mycolic acid isolation and the interpretation of the test results.

9 Limitations of the kit

9.1 Analytical limitations

- The kit is intended exclusively for the isolation of mycolic acids from the test material. Due to the

potential heterogeneity and diversity of samples, the manufacturer does not define recovery parameters for individual types of clinical material.

- In the case of the presence of more than one species or strain of mycobacteria of the *Mycobacterium* genus in the test sample, the obtained mycolic acid profile will reflect averaged values, proportional to the quantitative contribution of individual species. This may lead to interpretive difficulties — see section 7.3.
- Failure to follow the instructions for use of the kit may adversely affect the course and efficiency of mycolic acid isolation and the reliability of *FIA-MS/MS* analysis results.

9.2 Clinical limitations

- The test result does not constitute a standalone basis for clinical diagnosis and must be interpreted in conjunction with other laboratory test results and the patient's clinical presentation.
- The kit is not intended to be used as the sole diagnostic tool for tuberculosis or other mycobacterioses — it is a supporting tool and does not replace bacterial culture or other standard methods of mycobacterial identification.
- The *FIA-MS/MS* method using the ***M-Typer Reagent Kit*** does not allow assessment of mycobacterial drug susceptibility.

9.3 Technical limitations

- Analysis results are dependent on the technical performance of the *FIA-MS/MS* system — including mass spectrometer calibration, purity of mobile phases, and the technical condition of the autosampler and PEEK capillary.
- The use of analytical equipment other than that recommended by the manufacturer (section 3.2) may require additional parameter optimization and may affect the analytical parameters of the kit.
- Interpretation of results requires the use of the dedicated ***M-Typer Software*** (see section 7.1).

9.4 Storage and transport conditions affecting results

- Use of reagents beyond the expiry date stated on the label is not permitted and may lead to false or unreliable results.
- Failure to observe the recommended storage or transport conditions (section 2.6) may cause degradation of reagents and a reduction in isolation performance.
- After first opening, reagents must be used within the period stated in section 2.2. Exceeding this period may affect the quality of isolation and the reliability of results.

10 Literature

The following publications constitute the scientific basis for the method and were used in the development of the M-Typer Reagent Kit.

1. Konrad Kowalski et al., Kwasy mikołowe – rola biologiczna i potencjalne zastosowanie w wykrywaniu oraz różnicowaniu rodzaju *Mycobacterium*, „*Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*”, 68, 2014, s. 350–358,
2. Konrad Kowalski et al. Kwasy mikołowe – potencjalne markery diagnostyki oportunistycznych zakażeń mikroorganizmami z podrzędu *Corynebacterineae*, „*Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*”, 66, 2012, s. 461–468
3. Rafał, S., Magdalena, D., Karol, M. et al. Detection and accurate identification of *Mycobacterium* species by flow injection tandem mass spectrometry (FIA-MS/MS) analysis of mycolic acids. *Sci Rep* 15, 13118 (2025). <https://doi.org/10.1038/s41598-025-96867-x>
4. Głogowska A, Majewski K, Szulc B, Kowalski K, Augustynowicz-Kopeć E. Rapid clinical detection of mycobacterial infections using M-Typer and flow-injection tandem mass spectrometry. *IJTLD Open*. 2025 Dec 10;2(12):751-756. doi: 10.5588/ijtlldopen.25.0323. PMID: 41395324; PMCID: PMC12699965.

11 Hazardous substances

When working with reagents included in the M-Typer Reagent Kit, particular attention must be paid to the hazards listed below and appropriate precautionary measures must be taken. Detailed information on each reagent can be found in the safety data sheets (SDS/MSDS) available on the manufacturer's website: www.dimedical.pl/.....

MT-001 — Wash Reagent

Parameter	Hazard statements	
 	H225	Highly flammable liquid and vapor.
	H319	Causes serious eye irritation.
	H336	May cause drowsiness or dizziness.
	Precautionary statements	
	P210	Keep away from heat, hot surfaces, sparks, open flames and other ignition sources. No smoking.
	P233	Keep container tightly closed.
	P280	Wear eye protection.
	P337 + P313	If eye irritation persists: Seek medical advice/attention.
	P370 + P378	In case of fire: Use powder/sand/carbon dioxide extinguisher to extinguish.
	P403 + P235	Store in a well-ventilated area. Keep cool.

MT-002 — Hydrolysis Reagent

Parameter	Hazard statements	
  	H314	Causes severe skin burns and eye damage.
	H370	Causes damage to organs.
	H301 + H311 + H331	Toxic if swallowed, in contact with skin, or if inhaled.
	Precautionary statements	
	P260	Do not breathe dust/fume/gas/mist/vapours/spray.
	P280	Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.
	P301 + P330 + P331	IF SWALLOWED: Rinse mouth. Do NOT induce vomiting.
	P303 + P361 + P353	IF ON SKIN (or hair): Take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water or shower.
	P305 + P351 + P338	IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
	P310	Immediately call a doctor.

MT-003 — Neutralization Reagent

Parameter	Hazard statements	
	H315	Causes skin irritation.
	H319	Causes serious eye irritation.
	H335	May cause respiratory irritation.
	Precautionary statements	
	P261	Avoid breathing mist/vapours/spray.
	P264	Wash hands and exposed parts of the body thoroughly after handling.
	P280	Wear protective gloves.
	P312	Call a POISON CENTRE if you feel unwell.
	P321	Specific treatment (see supplemental first aid instructions on this label).
	P337 + P313	If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

MT-004 — Extraction Reagent

Parameter	Hazard statements	
 	H302	Harmful if swallowed.
	H315	Causes skin irritation.
	H319	Causes serious eye irritation.
	H331	Toxic if inhaled.
	H351	Suspected of causing cancer.
	H361d	Suspected of damaging the unborn child.
	H372	Causes damage to organs through prolonged or repeated exposure.
	Precautionary statements	
	P260	Do not breathe vapours.
	P264	Wash hands and exposed parts of the body thoroughly after handling.
	P280	Wear protective gloves.
	P304+P340	IF INHALED: Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing.
	P311	Call a doctor.
	P403 + P233	Store in a well-ventilated place. Keep container tightly closed.

MT-005 — Dilution Reagent

Parameter	Hazard statements	
  	H225	Highly flammable liquid and vapour.
	H370	Causes damage to organs.
	H301 + H311 + H331	Toxic if swallowed, in contact with skin, or if inhaled.
	Precautionary statements	
	P210	Keep away from heat, hot surfaces, sparks, open flames and other ignition sources. No smoking.
	P280	Wear protective gloves/protective clothing.
	P301+P310	IF SWALLOWED: Immediately call a doctor.
	P304+P340	IF INHALED: Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing.
	P308+P311	IF exposed or concerned: Call a doctor.
	P311	Call a doctor.
	P403 + P235	Store in a well-ventilated place. Keep cool.

Section A: Manufacturer Data

Manufacturer



Centrum Medycyny Klinicznej DiMedical Sp. z o.o.
ul. Żeromskiego 52
90-626 Łódź, Poland

Phone: (+48) 502 660 480

E-mail: kontakt@dimedical.pl

Website: www.dimedical.pl

Additional information

The manufacturer holds a certified quality management system compliant with **ISO 13485**.

Device identification

Element	Content
Device name	M-Typer Reagent Kit (Set 1 + Set 2)
Kit catalog number	MT-KIT-001
Set 1 catalog number	MT-KIT-SET1
Set 2 catalog number	MT-KIT-SET2
Batch / Lot number	Stated on the packaging label
Expiry date	Stated on the packaging label
IFU version number	IFU-M-TYPER-001-v1.0
IFU issue date	[to be completed upon approval]
Device classification	In vitro diagnostic medical device (IVD)
Device class	IVDR Class C

Section B: Reporting of Serious Incidents

A serious incident is an event related to the use of a medical device that has led or could lead to:

- death of the patient, user, or another person,
- serious deterioration of the health of the patient, user, or another person,
- a serious threat to public health.

In the event of a confirmed or suspected serious incident related to the ***M-Typer Reagent Kit***, the event must be reported immediately to the manufacturer and to the relevant national competent authority.

Manufacturer:

Centrum Medycyny Klinicznej DiMedical Sp. z o.o.
ul. Żeromskiego 52, 90-626 Łódź, Poland
tel. +48 502 660 480
e-mail: kontakt@dimedical.pl
www.dimedical.pl

Competent authority in Poland:

Prezes Urzędu Rejestracji Produktów Leczniczych,
Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (URPL)

In the event of external corrective safety actions (**FSCA**) taken by the manufacturer, users of the device will be informed by means of a Field Safety Notice (**FSN**).

Section C: Explanation of Symbols

The following symbols may appear on the packaging, label, or in these Instructions for Use of the *M-Typer Reagent Kit*.

Symbol	Meaning
	Manufacturer
	Country of manufacture
	Date of manufacture
	Use by (expiry date)
	Batch / Lot number
	Catalog number
	In vitro diagnostic medical device
	Contents sufficient for 100 tests
	Temperature limitation for storage
	Protect from light
	Contains hazardous substances (carcinogenic, mutagenic, or toxic to reproduction — CMR)
	Do not use if packaging is damaged, and consult the instructions for use
	Caution
	Consult instructions for use
	Unique Device Identifier (UDI)
	CE marking of conformity

