

## Monoclonal Mouse Anti-Human CD4, Clone MT310

Code No./ Code/ Code-Nr. C 7226 APC-Conjugated  
 Code No./ Code/ Code-Nr. F 0766 FITC-Conjugated  
 Code No./ Code/ Code-Nr. R 0805 RPE-Conjugated  
 Code No./ Code/ Code-Nr. C 7069 RPE-Cy5-Conjugated

### ENGLISH

**Intended use** For in vitro diagnostic use.  
 C 7226, F 0766, R 0805 and C 7069 are intended for use in flow cytometry. Measurement of the relative as well as the absolute number of CD4-positive cells in peripheral blood is critically important in assessing the immunological status of a patient. Additionally, antibodies to CD4 have an important role in the immunophenotyping of reactive lymphocytes and in the investigation of lymphoproliferative disorders (1). Interpretation of results must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a certified professional.

**Introduction** CD4 is a 55 kDa glycoprotein with four immunoglobulin-like external domains, a transmembrane domain and a highly conserved intracellular domain (1). CD4 acts as a coreceptor in MHC class II-restricted antigen-induced T-cell activation. Further, CD4 has a role in the regulation of T-B lymphocyte adhesion in the absence of antigen recognition, and in thymic differentiation (2).  
 CD4 is expressed on thymocyte subsets, it marks helper/inducer T cells, and it is expressed in 55-65% of mature peripheral T cells. Subpopulations of suppressor or cytotoxic T cells can be identified among CD4-positive T cells. CD4 is also expressed on monocytes/macrophages, Langerhans cells and other dendritic cells. CD4 is not expressed on B cells.  
 The majority of peripheral T-cell lymphomas are derived from the helper T-cell subset, so most postthymic T-cell neoplasms are CD4-positive (1).

**Reagent provided** The Anti-CD4 conjugates, C 7226, F 0766, R 0805 and C 7069, have been produced from a purified monoclonal mouse antibody. The conjugates are provided in liquid form in buffer containing 1% bovine serum albumin (BSA) and 15 mmol/L NaN<sub>3</sub>, pH 7.2. Each vial contains 100 tests (10 µL of conjugate for up to 10<sup>6</sup> leucocytes from normal human peripheral blood).  
Isotype: IgG1, kappa. Conjugate concentration mg/L: See label on vial.

Antibody Code No.	Fluorochrome	Negative Code No.	Control
F 0766	FITC (Fluorescein Isothiocyanate Isomer 1)	X 0927	
R 0805	RPE (R-Phycoerythrin)	X 0928	
C 7069	RPE-Cy5 (R-Phycoerythrin + Cyanine 5)	X 0955	
C 7226	APC (Allophycocyanin)	X 0968	

**Specificity** Anti-CD4, MT310, was included in the Second International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens, and studies by a number of laboratories confirmed its reactivity with the CD4 antigen (3).

**Precautions**

- For professional users.
- This product contains sodium azide (NaN<sub>3</sub>), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing.
- As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.

**Storage** Store in the dark at 2-8 °C. Do not use after expiration date stamped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user. There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact our Technical Services.

**Staining procedure**

- Collect venous blood into a test tube containing an anticoagulant.
- Isolate mononuclear cells by centrifugation on a separation medium. Alternatively, lyse the red cells after step 6.
- Wash the mononuclear cells twice with RPMI 1640 or PBS, pH 7.2-7.4.
- Mix 100 µL cell suspension with 10 µL fluorochrome-conjugated Anti-CD4.
- Use a non-reactive monoclonal antibody of the same isotype, and conjugated with the same fluorochrome, as a negative control (see table).
- Incubate in the dark at 4 °C for 30 minutes.
- Wash twice with PBS containing 2% BSA. Resuspend the cells in an appropriate fluid for flow cytometry, e.g. 0.3 mL 0.01 mol/L PBS, pH 7.4.

8. Analyse on a flow cytometer.

It is recommended to include a suitable positive and negative control sample with each run for reagent and preparation control. Note that fluorochrome conjugates are light sensitive, and samples should be protected from light during the staining procedure and until the analysis.

**Product-specific limitations** It has been observed that RPE-Cy5-conjugates may bind to monocytes, resulting in background staining (4).

### FRANÇAIS

**Intérêt** Pour diagnostic *in vitro*.  
 Les anticorps C 7226, F 0766, R 0805 et C 7069 sont destinés pour un usage en cytométrie en flux. Les mesures, relative et absolue, des cellules CD4-positives dans le sang périphérique revêtent une importance critique au cours de l'évaluation du statut immunologique d'un patient. De plus, les anticorps dirigés contre le CD4 jouent un rôle important dans l'immunophénotypage des lymphocytes réactifs et dans les explorations des troubles lymphoprolifératifs (1). L'interprétation des résultats doit être entreprise par un professionnel certifié dans le contexte de l'histoire clinique du patient et des autres examens diagnostics.

**Introduction** Le CD4 est une glycoprotéine de 55 kDa dotée de quatre domaines externes de type immunoglobuline, d'un domaine transmembranaire, et d'un domaine intracellulaire hautement conservé (1). Le CD4 agit comme un corécepteur de l'activation des cellules T induite par les antigènes de classe II. De plus, le CD4 joue un rôle dans la régulation de l'adhésion des lymphocytes T-B en l'absence de reconnaissance de l'antigène, et dans la différenciation thymique (2).  
 Le CD4 est exprimé sur les sous-populations de thymocytes, il marque les cellules T auxiliaires/inductrices, et il est exprimé sur 55 à 65% des cellules T périphériques mûres. Les sous-populations de cellules T suppressives ou cytotoxiques peuvent être identifiées parmi les cellules T CD4 positives. Le CD4 est également exprimé sur les monocytes/macrophages, les cellules de Langerhans et d'autres cellules dendritiques. Le CD4 n'est pas exprimé sur les cellules B.  
 La majorité des lymphomes périphériques à cellules T dérivent de la sous-population des cellules T auxiliaires, et de ce fait, la plupart des néoplasmes à cellules T post-thymiques sont CD4-positifs (1).

**Réactif fourni** Les conjugués anti-CD4, C 7226, F 0766, R 0805 et C 7069, ont été obtenus à partir d'un anticorps monoclonal purifié de souris. Les conjugués sont fournis sous forme liquide dans un tampon contenant 1% d'albumine sérique bovine (BSA) et 15 mmol/l de NaN<sub>3</sub>, à 7,2 de pH. Chaque flacon permet de réaliser 100 analyses (10 µl de conjugué pouvant traiter jusqu'à 10<sup>6</sup> de leucocytes provenant de sang périphérique normal humain).  
Isotype : IgG1, kappa. Concentration du conjugué mg/l: Voir l'étiquette sur le flacon de l'échantillon.

Code de l' anticorps	Fluor	Code du Contrôle Négatif
F 0766	FITC (Isomère 1 d'isothiocyanate de fluorescéine)	X 0927
R 0805	RPE (R-Phycoérythrine)	X 0928
C 7069	RPE-Cy5 (R-Phycoérythrine + Cyanine 5)	X 0955
C 7226	APC (Allophycocyanine)	X 0968

**Spécificité** Le MT310, anti-CD4, a été intégré au cours des « 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens », et les études réalisées par de nombreux laboratoires ont confirmé sa réactivité vis-à-vis du CD4 (3).

**Précautions d'emploi**

- Pour utilisateurs professionnels.
- Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN<sub>3</sub>), un produit chimique extrêmement toxique à l'état pur. Aux concentrations du produit, bien qu'il ne soit pas classé comme étant nuisible, l'azide de sodium peut réagir avec la tuyauterie en plomb et en cuivre pour former des dépôts hautement explosifs d'azides métallisés. Lors de l'élimination du produit, laisser couler l'eau à flot pour éviter toute accumulation d'azides métallisés dans la tuyauterie.
- Comme pour tout dérivé biologique dangereux à manipuler, une précision s'impose.

**Stockage** Conserver à l'obscurité entre 2° et 8°C. Ne pas utiliser au-delà de la date de péremption mentionnée sur le flacon. Si les réactifs ont été conservés dans d'autres conditions que celles qui sont préconisées, ces conditions doivent être vérifiées par l'utilisateur. Il n'existe pas de signe particulier pour indiquer l'instabilité de ce produit. Par conséquent, les contrôles doivent être opérés simultanément avec les échantillons du patient. En cas de résultats imprévus qui ne peuvent pas être expliqués par des changements de procédures de laboratoire et qu'un problème avec le produit est suspecté, contactez nos Services Techniques.

**Procédure d'immunomarquage**

- Prélever le sang veineux dans un tube à essais contenant un anticoagulant.
- Isoler les cellules mononucléaires par centrifugation dans un milieu de séparation. Sinon, lyser les globules rouges après l'étape 6.
- Laver les cellules mononucléaires deux fois avec du RPMI 1640 ou du PBS, à 7,2-7,4 de pH.
- Mélanger 100 µl de la suspension de cellules avec 10 µl de conjugué fluorochrome Anti-CD4.
- Utiliser un anticorps monoclonal non-réactif du même isotype, conjugué au même fluorochrome, en tant que contrôle négatif (voir tableau).
- Laisser incubé à l'obscurité, à 4°C, pendant 30 minutes.

- Laver deux fois avec du PBS contenant 2% de BSA. Remettre les cellules en suspension dans un liquide adapté à la cytométrie en flux, par exemple 0,3 ml PBS 0,01 mol/l, à 7,4 de pH.
- Analyser sur un cytomètre en flux.

Il est recommandé d'inclure un contrôle positif et négatif adéquat à chaque technique pour contrôler le réactif et la préparation. Remarque que les conjugués fluorochromes sont sensibles à la lumière, les échantillons doivent donc être protégés de cette dernière au cours de la procédure de coloration et jusqu'à l'analyse.

**Limitations spécifiques du produit**

Il a été observé que les conjugués RPE-Cy5 pouvaient se lier aux monocytes, ce qui se traduit par un marquage non spécifique (6).

**DEUTSCH**

**Zweckbestimmung**

Zur Verwendung für In-vitro-Untersuchungen.

C 7226, F 0766, R 0805 und C 7069 sind für den durchflusszytometrischen Gebrauch bestimmt. Die Bestimmung sowohl der relativen als auch der absoluten Zahl CD4-positiver Zellen im peripheren Blut ist von ausschlaggebender Bedeutung für die Einschätzung des immunologischen Status eines Patienten. Hinzu kommt, dass Antikörper gegen CD4 bei der Immunophänotypisierung der reaktiven Lymphozyten und bei der Diagnose lymphoproliferativer Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen (1). Die Befunde müssen unter Berücksichtigung der klinischen Anamnese des Patienten und im Kontext weiterer diagnostischer Verfahren von einem zertifizierten Facharzt interpretiert werden.

**Einleitung**

Als Glykoprotein mit 55 kDa verfügt CD4 über vier externe, Immunglobulin-artige Domänen, über eine transmembranische Domäne und eine in hohem Umfang erhaltene intrazelluläre Domäne (1). CD4 fungiert bei der MHC-Klasse II restringierten, Antigen-induzierten T-Zell-Aktivierung als ein Korezeptor. Zudem spielt CD4 eine Rolle bei der Regulation der T-B-Lymphozytenadhäsion bei Abwesenheit der Antigenerkennung und bei der vom Thymus ausgehenden Differenzierung (2).

CD4 wird auf Thymozyten-Untergruppen exprimiert, markiert T-Helfer-/Induktor-Zellen und wird in 55-65 % der reifen peripheren T-Zellen exprimiert. Bei CD4-positiven T-Zellen können Unterpopulationen suppressorischer oder zytotoxischer T-Zellen identifiziert werden. Die Expression von CD4 erfolgt zudem auf Monozyten/Makrophagen, Langerhans-Zellen sowie weiteren dendritischen Zellen, nicht jedoch auf B-Zellen.

Der überwiegende Teil peripherer T-Zell-Lymphome leitet sich von der Untergruppe der T-Helfer-Zellen ab, so dass die meisten postthymischen T-Zell-Neoplasmen CD4-positiv sind (1).

**Geliefertes Reagenz**

Die Anti-CD4-Konjugate C7226, F 0766, R 0805 und C 7069, stammen von einem gereinigten monoklonalen Maus-Antikörper. Die Konjugate werden in einer gepufferten Lösung mit 1 % bovinem Serumalbumin (BSA) und 15 mmol/l NaN<sub>3</sub>, pH 7,2, geliefert. Jedes Fläschchen ist ausreichend für 100 Tests (10 µl des Konjugats sind für bis 10<sup>6</sup> Leukozyten aus normalem, menschlichem peripheren Blut ausreichend).

Isotyp: IgG1, Kappa. Konjugat-Konzentration mg/l: Siehe Produktetikett.

Antikörper Code-Nr.	Fluorochrom	Negativkontrolle Code- Nr.
F 0766	FITC (Fluoresceinisothiocyanat-Isomer 1)	X 0927
R 0805	RPE (R-Phycoerythrin)	X 0928
C 7069	RPE-Cy5 (R-Phycoerythrin + Zyanin 5)	X 0955
C 7226	APC (Allophycozyanin)	X 0968

**Spezifität**

Anti-CD4, MT310, wurde Kontext des „Second International Workshop and Conference on Human Human Leucocyte Differentiation Antigens“ aufgenommen und Studien in einigen Laboratorien bestätigten seine Reaktivität mit CD4 (3).

**Hinweise und**

**Vorsichtsmaßnahmen**

- Für geschultes Fachpersonal.
- Dieses Produkt enthält Natriumazid (NaN<sub>3</sub>), eine in reiner Form hochtoxische chemische Verbindung. Bei den in diesem Produkt verwendeten Konzentrationen kann Natrium-Azid, obwohl nicht als gefährlich klassifiziert, mit in Wasserleitungen vorhandenem Blei oder Kupfer reagieren und zur Bildung von hochexplosiven Metall-Azid-Anreicherungen führen. Nach der Entsorgung muss mit reichlich Wasser nachgespült werden, um Metall-Azid-Anreicherung zu vermeiden.
- Wie bei allen aus biologischen Materialien gewonnenen Produkten müssen die ordnungsgemäßen Handhabungsverfahren eingehalten werden.

**Lagerung**

Im Dunkeln bei 2 – 8 °C lagern. Nicht nach dem auf dem Produkt angegebenen Verfallsdatum verwenden. Sollten die Reagenzien unter anderen Bedingungen als den beschriebenen aufbewahrt worden sein, so müssen diese vom Anwender verifiziert werden. Es gibt keine offensichtlichen Anhaltspunkte für die mögliche Instabilität dieses Produktes. Es sollten daher die Positiv- und Negativkontrollen gleichzeitig mit den Patientenproben mitgeführt werden. Wenn unerwartete Anfärbung beobachtet wird, welche durch Änderungen in den Labormethoden nicht erklärt werden kann und falls Verdacht auf ein Problem mit dem Antikörper besteht, ist bitte Kontakt mit unserem technischen Kundendienst aufzunehmen.

**Färbeprozedur**

- Venöses Blut in ein Antikoagulans enthaltendes Probenröhrchen gewinnen.
- Mononukleäre Zellen durch Zentrifugieren in einem Abtrennungsmidium isolieren Alternativ hierzu können die Erythrozyten im Anschluss an Schritt 6 aufgelöst werden.
- Mononukleäre Zellen zweimal mit RPMI 1640 oder mit PBS, pH 7,2 – 7,4, waschen.
- 100 µl der Zellsuspension mit 10 µl des fluorochromkonjugierten Anti-CD4 mischen.

- Als Negativkontrolle einen nicht reaktiven, monoklonalen Antikörper des gleichen Isotyps, konjugiert an dasselbe Fluorochrom, verwenden (s. Tabelle).
- Im Dunkeln bei 4 °C 30 Minuten lang inkubieren.
- Zweimal mit PBS waschen, das 2 % BSA enthält. Die Zellen in einer für Durchflusszytometrie geeigneten Flüssigkeit, z. B. 0,3 mL 0,01 mol/L PBS, pH 7,4, resuspendieren.
- Im Durchflusszytometer analysieren.

Es wird empfohlen, eine geeignete Positiv- und Negativkontrolle für jede Durchführung der Reagenz- und Präparationsprüfung mitzuführen. Es ist zu beachten, dass Fluoreszenzkonjugate lichtempfindlich sind und dass die Proben während des Färbeporgangs und bis zur Durchführung der Analyse vor Licht geschützt werden müssen.









**Produktspezifische Beschränkungen**

Die Bindung von RPE-Cy5-Konjugaten an Monozyten wurde beschrieben, wodurch eine Hintergrundfärbung möglich ist (4).

**References/ Références/ Literatur**

- Leong AS-Y, Cooper K, Leong FJW-M. Manual of diagnostic antibodies for immunohistology. London: Oxford University Press; 1999. p. 49-50.
- Piatier-Tonneau D. CD Guide. CD4. In: Mason D, André P, Bensussan A, Buckley C, Civin C, Clark E, et al., editors. Leucocyte typing VII. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 7th International Workshop and Conference; 2000 Jun 19-23; Harrogate, United Kingdom. New York: Oxford University Press Inc.; 2002. p. 750-51.
- Miedema F, Terpstra FG, Melief CJM. T cell-dependent immunoglobulin synthesis in the human system. Studies with T cell-specific monoclonal antibodies. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, editors. Leukocyte typing II. Proceedings of the 2nd International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens; 1984 Sept 17-20; Boston, USA. New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo: Springer-Verlag; 1986. Volume I. p. 213-22.
- van Vugt MJ, van den Herik-Oudijk IE, van de Winkel JGJ. Binding of PE-CY5 conjugates to the human high-affinity receptor for IgG (CD64). Blood 1996;88:2358-61.

**Explanation of symbols/ Légende des symboles/ Erläuterung der Symbole**

 Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer	 2°C – 8°C Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich	 Use by Utiliser jusque Verwendbar bis
 In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-Vitro-Diagnostikum	 Keep away from sunlight (consult storage section) Conserver à l'écart du soleil (se reporter à la section conservation) Lichtgeschützt lagern (siehe Abschnitt zur Lagerung)	 Manufacturer Fabricant Hersteller
 Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten	 Batch code Code du Lot Chargenbezeichnung	