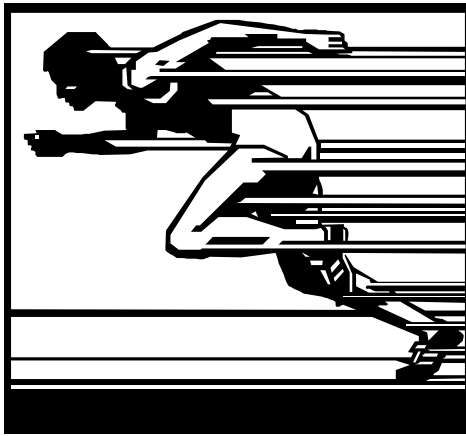




DAS ESCAPEE PHÄNOMEN

Copyright Becton-Dickinson

(frei nach dem Becton-Dickinson Source-Book, Internet Site: www.bdfacs.com; Stichwort „escapee“ suchen lassen)

Ich habe den Anfang übersetzt, um Ihnen den Einstieg zu erleichtern. Den Rest nicht, um mir die Arbeit zu erleichtern.

DEFINITION

Escapees sind Aggregate von Zellen (darunter positiv-markierte Zellen) die vom flow-zytometrischen Gate ausgeschlossen sind, und daher das Resultat der Analyse verfälschen.

BEOBACHTUNG

Ein Escapee-Phänomen könnte z.B. die Ursache dafür sein, daß die Summe aus %T + %B + %NK weniger als 95% ist, obwohl alle Gates korrekt gesetzt wurden. Dies ist durch den Ausschluß von Escapees aus dem Standardlymphozytengate bedingt. Zwei Dot-plots, die das Escapee Phänomen illustrieren sind weiter unten dargestellt. Mononukleäre Zellen eines normalen Spenders wurden Ficoll-getrennt. Monoklonale Anti CD8-FITC Antikörper von 2 verschiedenen Herstellern wurden verwendet. Die FSC vs FL1 Dot plots zeigen eine Population von CD8-positiven aggregierten Zellen die über das Lymphozytengate hinaus gehen. Diese Events, die einen erhöhten FSC aufweisen wurden in Sortierexperimenten als aggregierte Lymphocyten identifiziert. Da diese Zellen nicht im Standardlymphozytengate

enthalten sind führen sie zu einer Verminderung der positiven Zellen, die positiv für das markierte Antigen sind.

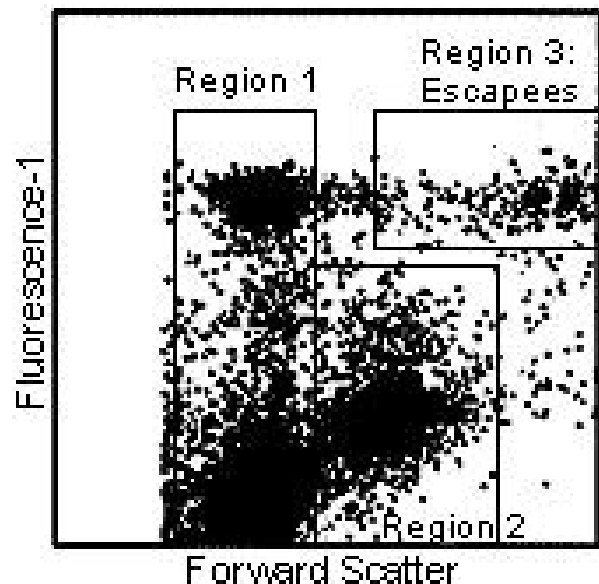
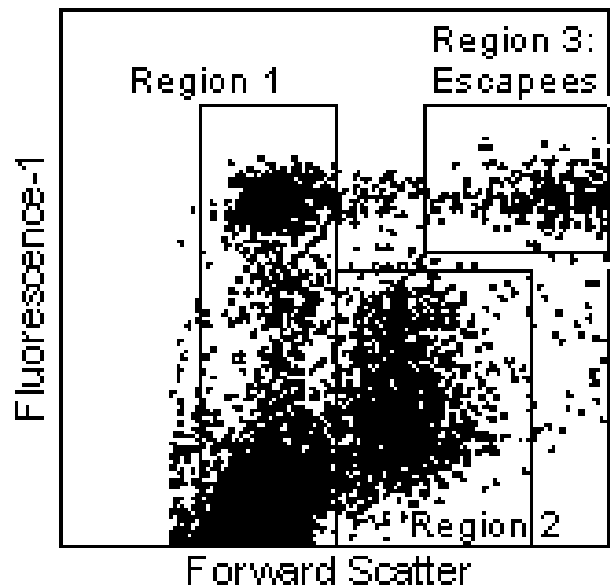


Figure Legend (1. Abbildung: CD8 von Hersteller 1, 2. Abbildung: CD8 von Hersteller 2): Region 1 includes the CD8-positive and CD8-negative single lymphocytes within the lymphocyte gate. Region 2 contains the monocyte population. Region 3 includes a population of bright CD8-positive events that are outside of the standard lymphocyte gate.

Use of various monoclonal antibodies such as CD8 and CD41 may cause cell aggregation in immunophenotyping assays, resulting in lower percentage positive values for the antigen of interest. The number of aggregates can vary

depending on whether a FITC- or PE-conjugated monoclonal antibody is used. When analyzing lymphocyte-gated CD8-positive cells, CD8 FITC conjugates have been shown to yield lower percentage positive values than CD8 PE conjugates for the same donor.¹ Escapees can also be detected when using an unconjugated purified monoclonal antibody and a Goat Anti-Mouse (GAM) Ig FITC second-step reagent. The number of escapees is partially dependent on the cell preparation method used. A peripheral blood mononuclear cell separation method will result in detection of more escapees than will a whole blood preparation stained and then lysed with FACS Lysing Solution.

EMPFEHLUNGEN

To decrease the number of escapees present, Becton Dickinson recommends using whole blood preparations that have been lysed with FACS Lysing Solution prior to flow cytometric analysis. See the FACS Lysing Solution package insert for a detailed procedure. For cell suspensions prepared by Ficoll-Paque separation, it is recommended that a high-protein medium be used, ie PBS containing 2% fetal calf serum and 0.1% sodium azide. Cell suspensions should be vortexed at a low speed, and samples should not be centrifuged with forces greater than 300 x g. Rough handling of cells such as excessive washing or high-speed vortexing may cause increased cell aggregation. Avoid the use of agents for monocyte depletion by phagocytosis (iron carbonyl particles) as these may increase the incidence of escapees. Even when taking these precautions during sample preparation, cell aggregation may still occur. For more information, contact the Customer Support Center at your local Becton Dickinson office.

LITERATUR

1. Jackson A. Basic Phenotyping of Lymphocytes: Selection and Testing of Reagents and Interpretation of Data. Clinical Immunology Newsletter. 1990;10(4):43-55.

ANMERKUNG:

Sie könnten fragen: sollten diese Aggregate aus zwei CD8-positiven Lymphozyten nicht auch eine höhere mittlere Fluoreszenzintensität haben? Da kommen ja 2 CD8er auf einmal durch. Wenn das auch in log-Darstellung schwer zu erkennen sein mag, scheint es dennoch auf den Diagrammen von BD nicht der Fall zu sein.

BD geht darauf nicht ein, aber erlauben sie mir folgende Überlegungen: 1. Man mißt ja meistens die Höhe des Fluoreszenzimpulses und nicht das Integral oder die Breite. 2. Wenn der Laserstrahl jetzt so breit ist, daß er beide Zellen des Aggregates gleichzeitig bestrahlt und als einen Impuls mißt, dann sollte das Signal höher sein als wenn nur eine Zelle gemessen wird. Ist der Laserstrahl aber so eng fokussiert, daß nie ein ganzes Aggregat sondern immer nur ein Teil davon bestrahlt wird, dann wird der gemessene Impuls von der Dichte der Fluoreszenzmoleküle an der Zelloberfläche, nicht aber von der Größe der Zelle oder des Aggregates abhängen.