

Der Retikulozyt und seine Bedeutung

Alle Blutzellen entstehen aus einer Stammzelle. Unter starker Proliferation differenzieren sie sich in Zellen der drei Blutzellreihen (Erythropoese, Granulopoese und Thrombopoese). Die Lebensdauer der zirkulierenden Erythrozyten beträgt etwa 120 Tage. Täglich wird etwa 1% der Erythrozytenmasse abgebaut und durch neue Zellen ersetzt. In einer Sekunde werden ungefähr zwei Millionen Erythrozyten gebildet. Aus dem orthochromatischen Erythroblasten entsteht durch Ausstoßung des Kerns der Retikulozyt, der ins periphere Blut übertritt.

Der Retikulozyt entwickelt sich durch Entfernung des endoplasmatischen Retikulums innerhalb von 4 Tagen zu einem reifen Erythrozyten. Dabei verweilt der Retikulozyt in der Regel noch 3 Tage im Knochenmark und 1 Tag im peripheren Blut. Der Name Retikulozyt stammt von der netzartigen Struktur, die nach Anfärbung mit Supravitalfarbstoffen wie Brilliantkresylblau oder Methylenblau (Präzipitation der Ribonukleinsäurereste) sichtbar wird (*Reticulum* ist die Verkleinerungsform von *rete* = Netz).

Historie

- 1865** Erstmalige Beschreibung von Retikulozyten durch *Erb*, der mit Pikrinsäure ein intrazelluläres Retikulum entdeckte.
- 1881** *Ehrlich* stellt mit einer Supravitalfärbung ein intrazelluläres Netzwerk, die Substantia reticulo-filamentosa, dar.
- 1891** *Smith* identifiziert die Retikulozyten als unreife Erythrozyten.
- 1932** Klassifizierung in Reifegrade durch *Heilmeyer* (siehe Tab.1).
- 1950** *Seip* quantifiziert die Reifegrade mit Referenzbereichen (siehe Tab.1).
- 1960** Zählung der Retikulozyten mit auf Fluoreszenz basierenden Methoden (*Acredine orange*), entwickelt durch *Kosenov & Mai*.
- 1983** *Tanke* automatisiert die Messung von Retikulozyten mit der Fluoreszenz-methode und Flowzytometrie.

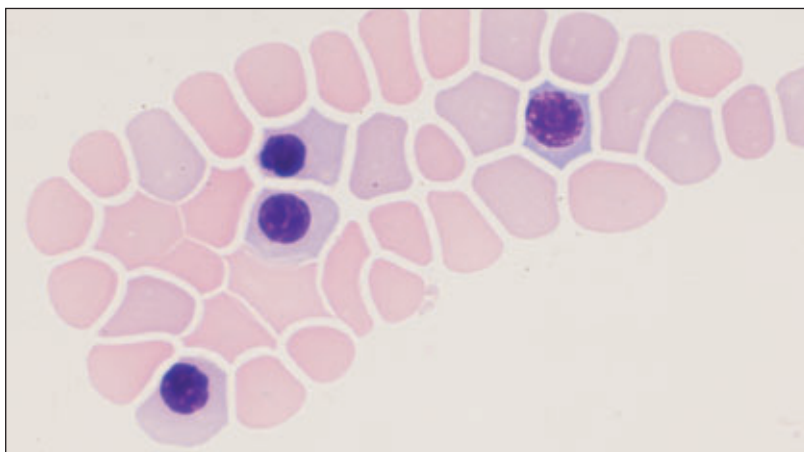
Reifestufen nach Heilmeyer	Morphologische Beschreibung	Quantifizierung nach Seip (normal %)
Stufe 0	Nukleolus	
Stufe I	Retikulum besteht aus dichten Klumpen	< 0,1
Stufe II	Locker organisiertes Retikulum	7,0
Stufe III	Diffus organisiertes Retikulum	32,0
Stufe IV	Einige verstreute Granula	61,0

Tab. 1: Reifestufen nach Heilmeyer

Die Reifungsstufen I und IV werden oft falsch interpretiert; die Stufe I wird manchmal als Erythroblast, die Stufe IV als Erythrozyt erkannt, da der geringe Anteil von RNS nicht als solcher gesehen wird. Die richtige Differenzierung der Stufe IV ist besonders bedeutsam, da im peripheren Blut überwiegend diese Reifungsstufe vorkommt.

Aufgrund der häufigen Fehlinterpretationen der Stufe IV haben Gilmer und Koepke 1976 den Retikulozyten definiert: »Ein Retikulozyt ist eine solche kernlose rote Blutzelle, die nach Anfärbung mit Neu-Methylenblau mindestens zwei oder mehr Partikel (»Dots«) blau gefärbten basophilen polyribosomalen Materials im Zytoplasma besitzt. Die Dots sollten fern vom Zellrand liegen, um Verwechslungen mit Heinz-Körperchen zu vermeiden. Auch Zellen mit deutlichen blauen zytoplasmatischen Granula, die ohne Feinfokussierung erkennbar sind, sind Retikulozyten der Reifungsstufe IV«.

1985 haben das Nationale Komitee für Standardisierung im klinischen Labor (NCCLC) in den USA und die ICSH die »Ein-Dot«-Zellen als Erythrozyten definiert (kein Retikulozyt) und als Bewertungsstandard für die mikroskopische (manuelle) Zählung und Zuordnung aufgenommen und empfohlen. Der Retikulozyt spiegelt die Regeneration der Erythropoese wider. Bei einem ausgeglichenen System



befinden sich im peripheren Blut zu > 90% die sehr reifen Ausreifungsstufen der Retikulozyten (Stufe III und IV).

Ist die Erythropoese stimuliert, verschiebt sich die Ausreifung ins periphere Blut = Shift (ähnlich einer Linksverschiebung bei der Granulopoese).

Fig. 1: Peripherer Blutaussstrich, Fahne
Polychromasie und rote Vorstufen bei schwerster Autoimmunhämolyse und ITP

Indikation zur Zählung der Retikulozyten

- Basisdiagnostik bei allen Anämien
- Therapiekontrolle bei Substitution von Eisen, Vitamin B12 oder Folsäure
- Therapiekontrolle unter Erythropoetin
- Monitoring bei Stammzelltransplantationen

Probenmaterial

EDTA-Blut

In-Vitro-Stabilität der Retikulozytenzählung

Die Bestimmung der Retikulozyten aus dem EDTA-Blut ist bis zu 72 Stunden nach Abnahme noch zuverlässig. Dabei hat die Lagertemperatur von + 4° C bzw. 20° C keinen signifikanten Einfluss auf das Messergebnis. (Studie 1).

Manuelle Zählung (Benötigtes Material: Supravitalfarbstoff, Objektträger, Mikroskop)

1. Vollblut wird mit gleichen Teilen eines Supravitalfarbstoffes, wie z. B. Brillantkresylblau, vermischt (gebrauchsfertige Probengefäße sind im Handel erhältlich).
2. Nach Inkubation wird die Probe auf einem Objektträger ausgestrichen und luftgetrocknet.
3. Auszählung der Retikulozyten am Mikroskop mit Ölimmersion bei 1000-facher Vergrößerung.
4. Ausgezählt werden 1000 Erythrozyten. Bei 1000-facher Vergrößerung entspricht dies meist fünf Gesichtsfeldern, in denen jeweils etwas 200 Erythrozyten liegen.
5. Angabe der Retikulozyten in Promille [‰] oder Prozent [%].

Der manuelle Zählfehler wird in der Literatur abhängig von der Retikulozytenzahl mit einem VK von 20-40% und höher angegeben. Für die Routine wird die Zählung von 1000 Zellen empfohlen. Nach einer Empfehlung des ICSH (1990) zur Zählrate im Referenzbereich der Retikulozyten sollten mindestens 4000 Zellen ausgezählt werden, um einen methodischen Fehler von 5 % nicht zu überschreiten. (Tab. 2)

Retikulozytenzahl im Blut (%)	Zu zählende Zellzahl, um einen VK von 5 % zu erzielen
1 – 2 (Referenzbereich)	4000
3 – 5	1000
6 – 10	600
20 – 25	150
30 – 40	100

Tab. 2: Einfluss der Zahl ausgezählter Erythrozyten auf den methodischen Fehler der Retikulozytenzählung. Die Angabe bezieht sich auf einen VK von 5 %.

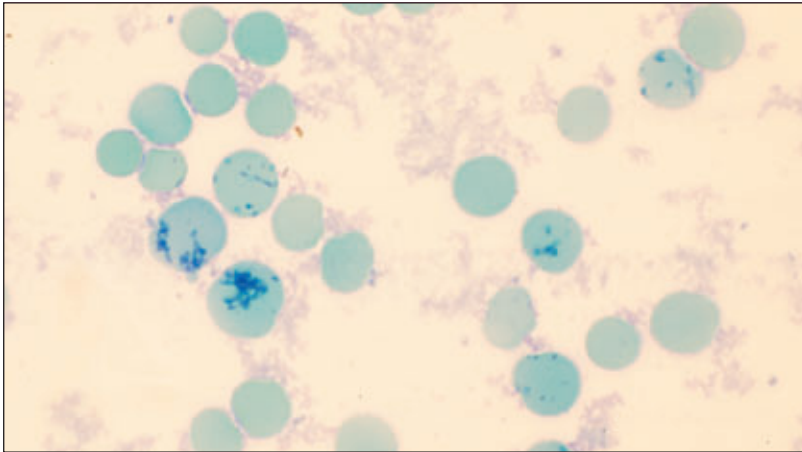


Fig. 2: Retikulozyten (Supravitalfärbung)

Automatisierte Zählung (z. B.: SYSMEX XE-2100, XT-2000i)

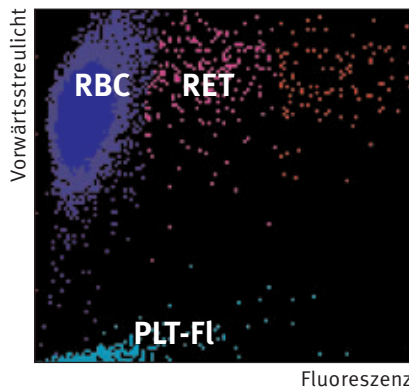


Fig. 3: Scattergramm des Retikulozyten-Messkanals, SYSMEX x-Class
 RBC = reife Erythrozyten,
 RET = Retikulozyten,
 PLT-Fl = Fluoreszenz-Thrombozyten

Für die Messung der Retikulozyten wird die Probe mit einem an RNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff inkubiert und durchflusszytometrisch gezählt. Automatisierte Retikulozytenzählungen geben objektive Schwellen für die Zuordnung von Zellen vor. Dies gewährleistet eine hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Bei einer automatisierten Zählung werden zwischen 10.000 bis 30.000 Erythrozyten ausgewertet. Damit erreicht man eine große Zählgenauigkeit und eine hohe Präzision. Im Vergleich zu der manuellen Retikulozytenzählung liegt das Ergebnis beispielsweise bei der automatisierten Zählung mit dem SYSMEX XT-2000i in weniger als einer Minute vor.

Die Bestimmung der Retikulozytenzahl und die Klassifikation (Reifeindex: LFR, MFR, HFR) geben Auskunft über die Aktivität der Erythropoese. Es ist üblich, den Retikulozyten-Wert in Prozent oder Promille der Erythrozytenzahl anzugeben.

Problematisch ist die Interpretation des Retikulozytenwertes bei schweren Anämien: Ein mäßig erhöhter Retikulozytenwert bei schwerer Anämie zeigt keine ausreichend starke Regeneration der Erythropoese an, sondern lediglich eine verkürzte Lebensdauer der Erythrozyten. Besser ist die Angabe der Retikulozytenkonzentration in Retikulozyten/ μl , da damit ein direkter Messwert für die Leistungsfähigkeit der Erythropoese vorliegt. Z. B. ist ein Wert von 20 ‰ Retikulozyten erhöht. Aber bei einer schweren Anämie mit 2 Mio. Erythrozyten ergeben 20 ‰ Retikulozyten lediglich 40.000 Retikulozyten/ μl , dies ist ein Wert im untersten Referenzbereich.

Relative Angabe (Retikulozyten ‰, %) \longrightarrow Lebensdauer der Erythrozyten
 Zellkonzentration (Retikulozyten / μl) \longrightarrow Leistungsfähigkeit der Erythropoese

Tab. 3: Vergleich der Retikulozyten-Parameter

Umrechnung von Relativangabe (%) auf Zellkonzentration (Reti/ μl):

$$\frac{\text{Reti [\%]} \times \text{Ery} [10^6/\mu\text{l}]}{100} = \text{Retikulozyten-Konzentration} [10^6/\mu\text{l}]$$

Referenzbereiche

Retikulozyten relativ:	w 0,54 – 2,02 ‰ m 0,48 – 1,64 ‰
Retikulozyten-Konzentration:	w 0,025 – 0,102 $10^6/\mu\text{l}$ m 0,026 – 0,078 $10^6/\mu\text{l}$

(Quelle: SYSMEX, für x-Class-Geräte)

Die Retikulozytenbestimmung mit der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (SYSMEX) ist der *Goldstandard* für die Zählung von Retikulozyten.

Retikulozytenindex = RI

Der relative Anteil (‰, ‰) der Retikulozyten kann ansteigen, wenn die Retikulozyten tatsächlich vermehrt sind oder die Erythrozyten vermindert sind. Eine Korrektur kann über den Hämatokrit des Patienten unter Bezug auf einen normalen Hämatokrit von 0,45 [l/l] erfolgen. Eine solche Korrektur wird bei Anämien empfohlen:

$$\text{RI} = \frac{\text{Reti [\%]} \times \text{Hkt [l/l]} (\text{Patient})}{0,45 \text{ [l/l]} (\text{Standard-Hkt})}$$

Retikulozytenproduktionsindex = RPI

Der RPI ist ein Index, der die Effektivität der Erythropoese und damit die Leistungsfähigkeit des Knochenmarks zu bewerten hilft.

Die physiologische Reifungszeit der Retikulozyten teilt sich auf in 3 Tage Reifung im Knochenmark und 1 Tag im peripheren Blut. Bei stark erhöhter Nachproduktion von Erythrozyten verlagert sich die Ausreifung der Retikulozyten ins periphere Blut (Shift), denn die Retikulozyten werden hier früher ins periphere Blut abgegeben. Dadurch steigt die Zahl der zirkulierenden Retikulozyten stark an, dies beweist aber nicht eine hohe Leistungsfähigkeit der Erythropoese. Diese veränderte Verweildauer im peripheren Blut wird Shift genannt. Die Reifungszeit der Retikulozyten im Knochenmark verhält sich proportional zum Hämatokrit, d.h., sie fällt mit dem Hämatokrit ab und entsprechend steigt die Reifungszeit im Blut an. Um eine Aussage über die Effektivität des Knochenmarkes machen zu können, wird die Retikulozytenzahl mit diesem vom Hämatokrit abhängigen Faktor korrigiert

Hämatokrit	Reti-Verweildauer im Blut
45% bzw. 0,450 l/l	1 Tag
35% 0,350 l/l	1,5 Tage
25% 0,250 l/l	2 Tage
15% 0,150 l/l	2,5 Tage

$$\text{RPI} = \frac{\text{RET} [\%]}{\text{RET-Reifungszeit im Blut in Tagen}} \times \frac{\text{Hkt [l/l] (Patient)}}{0,45 \text{ (Standard-Hkt)}}$$

Beispiel:

Patient-Hkt = 0,25 l/l , Retikulozyten = 20

$$\text{RPI} = \frac{20 [\%]}{2} \times \frac{0,25}{0,45} = 5,5$$

RPI-Bewertung

Normalfall	1
Anämie mit adäquater Regeneration	> 2
Anämie mit inadäquater Regeneration	< 2

IRF = Immature Reticulocyte Fraction

Indikation

Der IRF-Wert ist ein sehr früher Marker zur Einschätzung der Regeneration der Erythropoese. Der IRF-Prozentsatz steigt schon nach wenigen Stunden an, während die Retikulozytenzahl erst nach zwei bis drei Tagen ansteigt.

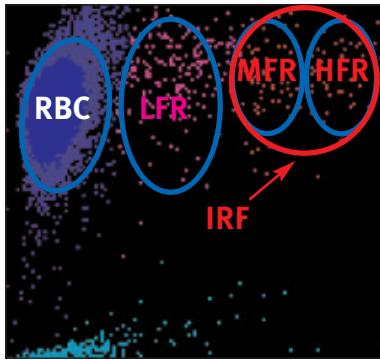
Bleibt ein Anstieg des IRF-Wertes bei Therapie mit Erythropoetin oder Vitaminen bei Mangelanämien aus, so deutet das auf ein mangelndes Ansprechen auf die Therapie hin. Zusätzlich hilft der Retikulozytenreifeindex bei der Klassifizierung von hypo-, normo- und hypergeneratorischen Anämien.

Der IRF-Wert zusammen mit der Retikulozytenzahl hat sich als Monitoringparameter bei Knochenmark- bzw. Stammzell-Transplantationen bewährt. Es zeigt sich, dass bei einer erfolgreichen Transplantation in 80% der Fälle der IRF-Wert die 5% Marke eher erreicht, als die Granulozyten die klassische Grenze von $0,5 \times 10^9$ (Studie d. Onofrio et al. Clin. Lab. Haem 1996 18 Suppl. 45-53).

Die Fluoreszenz-Flowzytometrie-Methode erlaubt über die übliche Retikulozytenmessung hinaus eine Einteilung der Retikulozyten in drei Reifestufen. Diese Reifestufen werden durch den RNA-Gehalt der Retikulozyten definiert (am Gerät: Fluoreszenzintensität).

Retikulozytenreife

LFR	MFR	HFR
Low	Medium	High
Fluoreszenz	Fluoreszenz	Fluoreszenz
Retikuloocyte	Retikuloocyte	Retikuloocyte
Wenig RNA	Mehr RNA	Viel RNA
Reife Retikulozyten	Mittlereife Retikulozyten	Unreife Retikulozyten
Referenzbereich:	Referenzbereich:	Referenzbereich:
86,5 - 98,5 %	1,5 - 11,3 %	0 - 1,4 %



IRF ist die Summe aus MFR und HFR, also den unreifen Retikulozyten und wird auch Retikulozytenreife-Index genannt.

$$\text{IRF} = \text{MFR} + \text{HFR}$$

Referenzbereich:

IRF: w 1,1 – 15,9 %
m 1,5 – 13,7 %

Fig. 4: Scattergramm Retikulozyten-Messkanal, SYSMEX x-Class Geräte

In-Vitro-Stabilität IRF

6 Stunden

Klinische Anwendung IRF

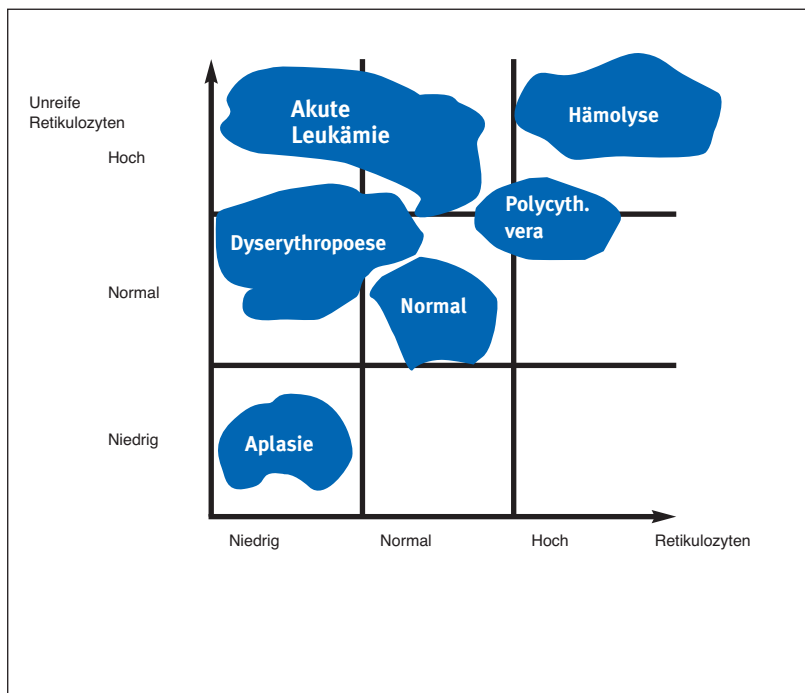


Fig. 5: d'Onofrio (1996). Reticulocytes in haematological disorders. *Clinical and Laboratory Haematology* 18,29-34.

RET-H_e

Über die lediglich quantitative Bestimmung der Blutbildparameter hinaus (RBC, Hgb, Retikulozyten, IRF, Erythrozytenvolumen) steht mit dem RET-H_e nun auch eine qualitative Kenngröße zur Verfügung. Der Parameter RET-H_e (Retikulozyten-Hämoglobin-äquivalent) gibt den Hgb-Gehalt der neu gebildeten Erythrozyten an und gibt damit eine zeitnahe Information über die Eisenversorgung der Erythropoese. Dies ist besonders nützlich für die Unterscheidung der beiden häufigsten Anämien (Eisenmangelanämie und Anämie bei »chronischer Erkrankung« (ACD), also zur Unterscheidung eines tatsächlichen Eisenmangels von einem »funktionalen« Eisenmangel (Eisenmobilisationsstörung).

Die Bestimmung des RET-He kann am Hämatologieanalysator zusammen mit den Routineparametern des peripheren Blutes durchgeführt werden. Es ist ein großer Vorteil, dass der RET-He im Gegensatz zu den Parametern Ferritin oder Transferrin nicht von der »akuten Phase« beeinflusst wird.

Indikation

- Klassifikation von normochromen und hypochromen Anämien, Abgrenzung bei Eisenmangelanämien und »funktionalen« Eisenmangel
- Monitoring bei Therapie von chronischen Infekten oder Tumoren
- Monitoring bei der Erythropoetintherapie und Eisensubstitution

Referenzbereich

RET-He: 28 – 35 pg

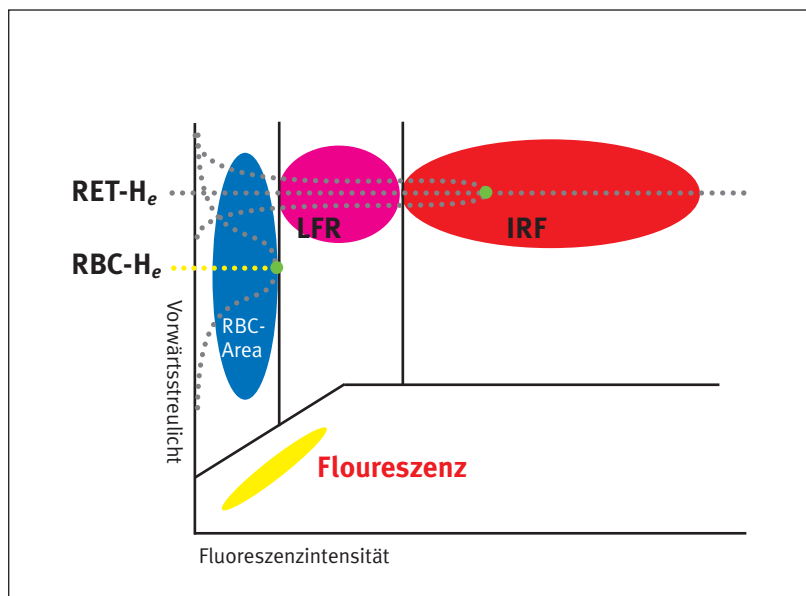


Fig. 6: Retikulozytenkanal des SYSMEX XE-2100, Lage der Fluoreszenzparameter der roten Zellreihe im Scattergramm

Goldstandard

Definition: Mit Goldstandard wird etwas bezeichnet, das bislang unübertroffen ist oder selber ein Ziel darstellt. In der Medizin wird das jeweils beste Handeln bezüglich einer Krankheit als Goldstandard bezeichnet; der Begriff taucht in verschiedenen Zusammenhängen auf:

- a. Methoden zum Nachweis oder Ausschluss einer Erkrankung
- b. Für Therapie von Erkrankungen, insbesondere bei bestimmten Krankheitsstadien
- c. Bei der Planung von Studien

(www.wikipedia.de)

Quellennachweis

Studie 1: In Vitro stability of reticulocyte count, Cavill, Kraaijenhagen, Pradella, D'Oonofrios, Herkner, Rowan, Theodorsen, Tichelli: (Clin. Lab. Haem 1996, 18 (suppl.) 9-11

*Manual zum Mikroskopierkurs Hämatologie 2005
(R. Fuchs, J. Thomalla)*

*Praktische Hämatologie
(Herbert Begemann, Michael Begemann, Thieme)*

*Internet www.de.wikipedia.org/wiki/Hauptseite
Freie Enzyklopädie*

*Internet www.fpnotebook.com/HEM82.htm
Family Practice Medicine Resource*

*Retikulozyten: Reifung – Analytik – Klinische Bedeutung
B. Porstmann, Verlag Wachholz*

Fotos: Dr. Binder, Wuppertal