



Der
Retikulozyt

Der Retikulozyt und seine Bedeutung

Alle Blutzellen entstehen aus einer Stammzelle, die sich unter starker Proliferation in Zellen der drei Blutzellreihen differenzieren (Erythropoese, Granulopoese und Thrombopoese).

Die Lebensdauer der zirkulierenden Erythrozyten beträgt etwa 120 Tage. Täglich werden etwa 1 % der Erythrozytenmasse abgebaut und durch neue Zellen ersetzt. In einer Sekunde werden ungefähr zwei Millionen Erythrozyten gebildet. Aus dem orthochromatischen Erythroblasten wird durch Ausstoßung des Kerns der Retikulozyt gebildet, der ins periphere Blut übertritt.

Der Retikulozyt entwickelt sich durch Entfernung des endoplasmatischen Retikulums innerhalb von vier Tagen zu einem reifen Erythrozyten. Dabei verweilt der Retikulozyt in der Regel noch drei Tage im Knochenmark und einen 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 reticulofilamentosa, 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 (Acridine orange), entwickelt durch *Kosenov & Mai*
- 1983** *Tanke* automatisiert die Messung von Retikulozyten mit der Fluoreszenzmethode und Flowzytometrie

Tabelle 1: Reifestufen nach Heilmeyer

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

Die Reifestufen I und IV werden oft falsch interpretiert. Die Stufe I wird manchmal als Erythroblast erkannt und die Stufe IV als Erythrozyt, weil der geringe Anteil von RNS nicht als solche gesehen wird. Die richtige Differenzierung der Stufe IV ist besonders bedeutsam, da im peripheren Blut überwiegend diese Reifestufe 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 Reifestufe IV.“

1985 hat 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).

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.⁽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 1000facher Vergrößerung
4. Ausgezählt werden 1000 Erythrozyten. Bei 1000facher Vergrößerung entspricht dies meist fünf Gesichtsfeldern in denen jeweils etwa 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)

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

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

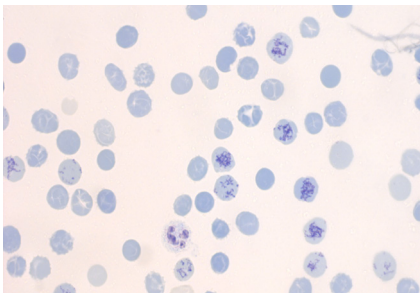


Bild 1: Retikulozyten (Supravitalfärbung) (Quelle: Herwartz R., Aachen)

Automatisierte Zählung am Beispiel der XN-Serie mit Applikation RET

Für die Messung der Retikulozyten wird die Probe mit einem an RNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff inkubiert und durchflusszytometrisch gezählt.

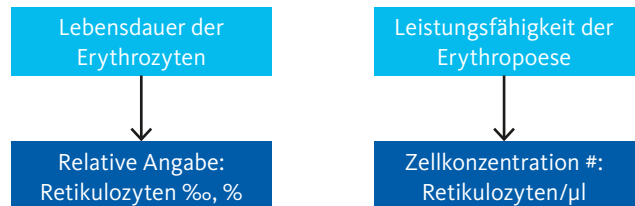
Automatisierte Retikulozyten-Zählungen geben objektive Schwellen für die Zuordnung von Zellen vor. Dies gewährleistet eine hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Bei einer automatisierten Zählung werden zwischen 10.000 bis 30.000 Erythrozyten ausgewertet. Damit erreicht man eine große Zählgenauigkeit und eine hohe Präzision. Im Vergleich mit der manuellen Retikulozytenzählung liegt das Ergebnis beispielsweise bei der automatisierten Zählung mit dem Sysmex XN-Modul in weniger als einer Minute vor und kann mit der

laufenden Analytik für Blutbildmessungen (CBC+RET, CBC+DIFF+RET, RET) nahtlos eingefügt werden.

Die Messung der Retikulozytenzahl und die Klassifikation in die Reifegrade (LFR, MFR, HFR, siehe weiter unten im Text) geben Auskunft über die Aktivität der Erythropoese. Es ist üblich, den Retikulozyten-Wert in Prozent oder Promille zur Erythrozytenzahl anzugeben. Idealerweise werden die Retikulozyten auch in absolut (Reti/µl oder Reti 10⁹/L oder vergleichbares) angegeben, denn problematisch ist die Interpretation der Retikulozytenzahl bei schweren Anämien.

Eine mäßig erhöhte Retikulozytenzahl 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 absolut (#), z. B. in Retikulozyten/µl, da damit ein direkter Messwert für die Leistungsfähigkeit der Erythropoese vorliegt.

Beispielsweise ist die Retikulozytenzahl von 20 % erhöht. Aber bei einer schweren Anämie mit 2 Mio. Erythrozyten, ergeben 20 % Retikulozyten lediglich 40.000 Retikulozyten/µl, dies ist ein Wert im unteren Referenzbereich.



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

$$\frac{\text{Reti [\%]} \times \text{Ery [10}^9\text{/}\mu\text{l}]}{100} = \text{Retikulozyten-Konzentration [10}^9\text{/}\mu\text{l]}$$

Referenzintervall ⁽³⁾:
w/m RET %: 0,7-2,0
w/m RET 10⁹/L: 32,8-97,7

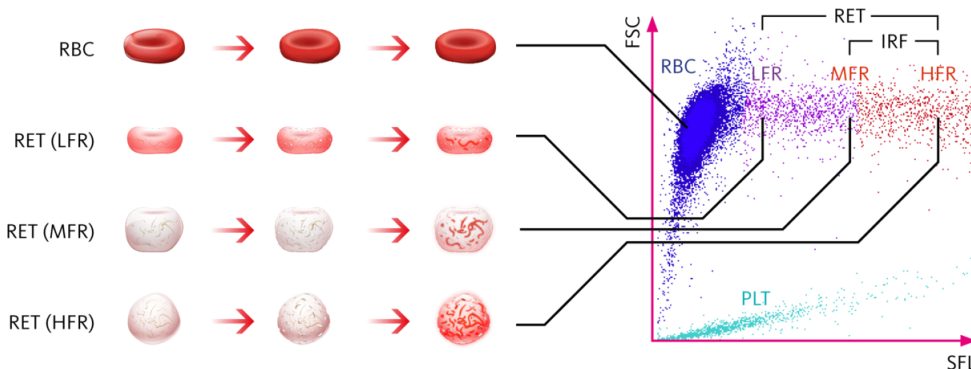


Bild 2: Scattergramm RET-Kanal, Sysmex XN-Serie
RBC = reife Erythrozyten, RET = Retikulozyten, PLT = optische Thrombozyten, FSC = Vorwärts-Streulicht, SFL = Seitwärts-Fluoreszenzlicht

Retikulozyten-Reifestufen

Die Fluoreszenz-Durchflusszytometrie-Methode erlaubt über die übliche Retikulozyten-Messung hinaus eine Einteilung der Retikulozyten in drei Reifestufen. Diese Reifestufen werden durch den RNA-Gehalt der Retikulozyten definiert.

LFR	MFR	HFR
Low Fluoreszenz Retikulozyte	Medium Fluoreszenz Retikulozyte	High Fluoreszenz Retikulozyte
Wenig RNA	Mehr RNA	Viel RNA
Reife Retikulozyten	Mittlereife Retikulozyten	Unreife Retikulozyten
Referenzbereich ⁽³⁾ 86,2-97,6 %	Referenzbereich ⁽³⁾ 2,5-11,9 %	Referenzbereich ⁽³⁾ 0-2,3 %

IRF = Immature Reticulocyte Fraction

IRF ist die Summe aus MFR und HFR, den unreifen Retikulozyten, und wird auch **Retikulozytenreife-Index** genannt (siehe Bild 2).

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

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

Der IRF-Wert zusammen mit der Retikulozytenzahl hat sich als Monitoring-Parameter 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 $0,5 \times 10^9$. ⁽¹⁾

Referenzintervall ⁽³⁾: w/m IRF: 2,7-13,8 %

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-Wert (Hkt) des Patienten oder der Patientin unter Bezug auf einen Standard-Hämatokrit-Wert von 0,45 [l/l] erfolgen. Eine solche Korrektur wird bei Anämien empfohlen:

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

Retikulozyten-Produktions-Index = 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 drei Tage Reifung im Knochenmark und einen 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-Wert, d. h. sie fällt mit dem Hämatokrit-Wert ab und entsprechend steigt die Reifungszeit im Blut an. Um eine Aussage über die Effektivität des Knochenmarkes machen zu können, wird die relative Retikulozytenzahl mit diesem vom Hämatokrit-Wert abhängigen Faktor korrigiert. ⁽²⁾

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

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

Beispiel:

Patient-Hkt 0,25 l/l

Retikulozyten 20 %

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

RPI-Bewertung:

Normalfall (Hb normal, Bildung und Abbau der Erythrozyten im Gleichgewicht): 1

Anämie mit adäquater Regeneration: > 2-3

Anämie mit hypoplastischer oder ineffektiver Erythropoese: < 2

RET-He

Über die quantitative Bestimmung der Blutbildparameter hinaus steht mit RET-He nun auch eine qualitative Kenngröße zur Verfügung.

Der Parameter RET-He (Retikulozyten-Hämoglobinäquivalent) gibt den Hämoglobin-Gehalt der Retikulozyten an und ermittelt so die Quantität (erythropoetische Aktivität) und Qualität (Hämoglobinsynthese und -aufnahme) der neu gebildeten roten Blutzellen.

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). RET-He ist unabhängig von einer Akute-Phase-Antwort und daher besser für die Interpretation eines Eisenmangels geeignet als Ferritin und Transferrin.

Die Bestimmung RET-He kann mit der XN-Serie zusammen mit den Routineparametern des peripheren Blutes und der Anforderung Retikulozyten durchgeführt werden.

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
- als präoperative Diagnostik innerhalb des Patient Blood Managements zur Erkennung und Monitoring eines Eisenmangels

Referenzintervall ⁽³⁾:

w/m RET-He: 29,3 – 35,4 pg

w/m RET-He: 1,818 – 2,197 fmol

Delta-He

Delta-He, die Differenz zwischen RET-He und RBC-He, ist ein Maß für den Unterschied zwischen der Hämoglobinisierung von Retikulozyten und der Hämoglobinisierung von reifen Erythrozyten.

$RET-He - RBC-He = \text{Delta-He}$

Normalerweise ist dieser Wert im positiven Bereich, da Retikulozyten quantitativ mehr Hämoglobin enthalten als Erythrozyten.

Ein negativer Delta-He-Wert zeigt an, dass die Hämoglobinisierung der Retikulozyten im Vergleich zur Hämoglobinisierung der reifen Erythrozyten-Population eingeschränkt ist und somit sagt er aus, dass die für die Erythrozyten-Bildung zur Verfügung stehende Eisenmenge aktuell für die Aufrechterhaltung des Hämoglobinspiegels nicht ausreicht.

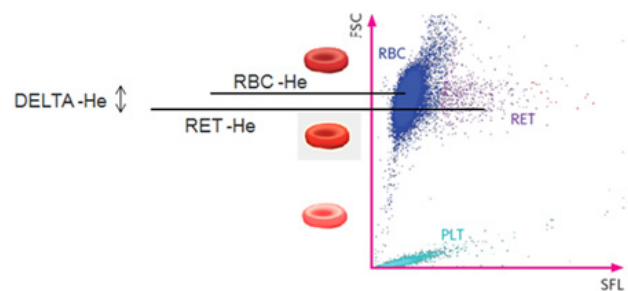


Bild 3: Retikulozytenkanal des Sysmex XN-Serie, Scattergramm

Referenzintervall ⁽³⁾:

w/m Delta-He: 1,2 – 3,6 pg

w/m Delta He: 0,075 – 0,223 fmol

Ein negativer Delta-He-Wert ist ein Zeichen einer Akute-Phase-Reaktion und zeigt binnen Stunden eine systemische bakterielle Infektion an und kann zur Ergänzung zu klassischen Parametern wie CRP oder PCT (Procalcitonin) bei Verdacht auf Sepsis werden.⁽⁴⁻⁷⁾ Wenn Bakterien in den Körper gelangen und eine Entzündung auslösen, steigen Zytokine, wie z. B. Interleukin 6 und Botenstoffe des Immunsystems an. Dieses erste unspezifische Alarmsignal löst unter anderem einen Anstieg von Hepcidin, einem Akute-Phase-Protein, aus. Hepcidin sorgt dafür, dass Eisentransportproteine auf der Zelloberfläche internalisiert werden. Dies ist ein Schutzmechanismus des Körpers, um eingedrungenen Bakterien das Eisen zu entziehen, das für ihre Entwicklung benötigt wird. Infolgedessen kommt es zu einer Unterversorgung von Eisen für die Erythropoese und einer Negativierung des Delta-He, wenn das Hämoglobin-Äquivalent reifer Erythrozyten das von Retikulozyten übersteigt.

Literatur

Begemann H, Begemann M: *Praktische Hämatologie*, Thieme.

Bild 1: Copyright 2022 – **Reinhild Herwartz**, Universitätsklinikum Aachen AÖR, Klinik für Hämatologie, Onkologie, Hämostaseologie und Stammzelltransplantation (Med. Klinik IV)

- [1] **Cavill et al. (1996):** *In vitro stability of reticulocyte count.* Clin. Lab. Haem, 18 (suppl.) 9-11
- [2] **Fuchs R., Staib P.:** *Manual Hämatologie 2022*, 32. Auflage, Nora-Verlag
- [3] **L van Pelt J et al. (2022):** *Reference intervals for Sysmex XN hematological parameters as assessed in the Dutch Lifelines cohort.* Clin Chem Lab Med 60(6): 907.
- Free online: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/cclm-2022-0094/html>

- [4] **Weimann K et al. (2015):** *Intensive Care Infection Score – A new approach to distinguish between infectious and noninfectious processes in intensive care and medicosurgical patients.* J. Int Med. Res. 43(3): 435–51.
- [5] **Hoffmann C et al. (2015):** *Diagnostic testing for a high-grade inflammation: parameter dynamics and novel markers.* Clin Chem Lab Med 53(4): 541-547.
- [6] **Danielson K et al. (2014):** *Delta-He: a novel marker of inflammation predicting mortality and ESA response in peritoneal dialysis patients.* Clin Kidney 7: 275-281.
- [7] **Weimann et al. (2016):** *Delta-He, Ret-He and a new diagnostic plot for differential diagnosis and therapy monitoring of patients suffering from various disease-specific types of anemia.* Clin Lab, 62: xx-xx. DOI: 10.7754/Clin.Lab.2015.150830. (epub ahead of print).