

XT-2000i RET MASTER zur Messung des Hämoglobingehalts der Retikulozyten

In jedem Mikroliter Blut sorgen ca. 5 Mio. Erythrozyten dafür, dass unser Organismus mit genügend Sauerstoff versorgt wird. Diese Erythrozytenmasse wird über einen Regelmechanismus unter Einwirkung von Erythropoetin in Abhängigkeit des Sauerstoffgehalts im Gewebe gesteuert. Für die Erythropoese, die im Knochenmark stattfindet, werden täglich 6 – 7 g Hämoglobin gebildet. Dafür werden 30 – 40 mg Eisen benötigt. Der Retikulozyt als Vorläufer der Erythrozyten reift 3 Tage im Knochenmark und, abhängig vom Hämatokrit, 1 – 2 weitere Tage im peripheren Blut. Er ist somit ein früher und spezifischer Marker zur aktuellen Beurteilung der Erythropoese sowie deren Eisenversorgung!

Eisenmetabolismus

Ca. 1 mg Eisen wird von gesunden Personen täglich absorbiert, um den natürlichen Eisenverlust auszugleichen. Die Eisenaufnahme erfolgt hauptsächlich im Duodenum, wobei die Aufnahmemenge vom individuellen Eisenstatus abhängt. Das Körpereisen kann in drei verschiedenen Formen vorkommen (Tab.1).

Speichereisen	Transporteisen	Funktionseisen
Ferritin Hämosiderin	Transferrin	Häm-gebunden 65% Myoglobin 5% Häm-haltige Enzyme 0,2% Nicht Häm-gebundenes Eisen 10%
ca. 20% des gesamten Eisens	ca. 0,1% des gesamten Eisens	ca. 80 % des gesamten Eisens

Tab. 1 Aufteilung des Körpereisens

Der Eisenmangel ist ein bedeutendes Gesundheitsproblem sowohl in den Entwicklungs- als auch gleichermaßen in Industrieländern und ist weltweit eine der häufigsten Ursachen für Anämien. Besonders bei Kindern in der Wachstumsphase ist auf eine ausreichende Eisenversorgung der Erythropoese zur Vermeidung von intellektueller und motorischer Entwicklungsverzögerung zu achten.

Wichtig für die Behandlung ist, nicht nur den Eisenmangel als Symptom, sondern auch seine Ursache zu ermitteln. Die Ursachen für eine Störung der Eisen-Hämostase können vielfältig sein und werden in 5 Hauptgruppen eingeteilt:

1. Unzureichende Eisenzufuhr	Mangelernährung, Ernährungsverhalten (Vegetarier, ältere Menschen)
2. Verminderte Eisenaufnahme	Teilresektionen des Magens, Dünndarm, Crohn'sche Erkrankung, chronische Gastritis
3. Gesteigerter Eisenbedarf	Schwangere, Neugeborene, Kleinkinder, Kinder in der Wachstumsphase, Ausdauersportler
4. Blutverlust	Menstruation, Geburt, Operationen, Magengeschwüre, Polypen, Blutspender
5. Funktioneller Eisenmangel	Beim funktionellen Eisenmangel übersteigt der Eisenbedarf der Erythropoese das Maß, in dem das Eisen aus den Speichern freigesetzt werden kann.

Zur Erkennung eines Eisenmangels sind die Labortests zur Überprüfung der Eisenspeicher regelmäßige Anforderungen in einem klinisch-chemischen Labor.

Eisenstatus

Der Eisenmangel entwickelt sich schleichend und durchläuft 3 Stadien:

- 1. Stadium:** Der Speichereisenmangel; dieser ist gekennzeichnet durch niedriges Speichereisen (bestimmt als Ferritin), ohne dass die funktionalen Eisenkompartimente (z. B. Hämoglobin) messbar beeinträchtigt sind. Das Transferrin ist häufig erhöht, die Transferrin-Sättigung vermindert.
- 2. Stadium:** Die eisendefiziente Erythropoese entwickelt sich, wenn im Knochenmark nicht mehr genügend Eisen für die Erythropoese zur Verfügung steht. Ferritin und Transferrinsättigung sind jetzt deutlich vermindert, der lösliche Transferrinrezeptor ist jetzt deutlich erhöht. Die Hämoglobinwerte liegen hierbei jedoch noch innerhalb des Referenzintervalls, allerdings oft schon am unteren Rand.
- 3. Stadium:** Das finale Stadium ist die Eisenmangelanämie, in welcher die Beeinträchtigung der Hämoglobinsynthese durch den Eisenmangel bereits erfolgt ist und sich in einer generalisierten Anämie manifestiert.

Definition der Anämie nach WHO (World Health Organization):

1. Verminderung der Hämoglobinkonzentration

Frauen: < 12,0 g/dL (7,5 mmol/L)

Männer: < 13,0 g/dL (8,1 mmol/L)

Die Anämie ist stets ein Symptom, dessen Ursache zu suchen ist!

Ein besonderes Augenmerk sollte Anämien infolge chronischer Erkrankungen (ACD = Anaemia of Chronic Disease) gelten. Hier liegt in erster Linie kein »klassischer Eisenmangel« vor. Diesen Zustand findet man häufig bei rheumatoider Arthritis und anderen chronisch-entzündlichen Erkrankungen, bösartigen Erkrankungen (Tumoren, Krebs) und chronischer Niereninsuffizienz. Die Anämie ist häufig normochrom/normozytär mit Veränderungen im Eisenstoffwechsel. Obwohl Ferritin häufig im Referenzintervall liegt oder sogar erhöht ist, wird das Eisen vom retikuloendothelialen System (RES) nicht für die Erythropoese bereitgestellt. Aber auch eine ACD kann mit einem echten Eisenmangel zusammen gehen und als Mischform erscheinen.

Damit ein echter Eisenmangel eindeutig von einer ACD differenziert werden kann, wird idealerweise die Bestimmung des Eisenstatus so durchgeführt, dass alle drei Stadien der Eisenmangelentwicklung detektiert werden.

Bestimmung des Eisenstatus im Labor

Der erste Screening-Test ist das *Blutbild (KBB)*. Das Vorliegen einer Anämie wird durch die Beurteilung von Hämoglobin, Erythrozytenzahl, MCV, MCH und MCHC rasch erfasst. Der RDW-Wert gibt einen Hinweis auf Anisozytose, ein gleichzeitig erhöhter Thrombozytenwert hingegen könnte auf eine Blutung hindeuten. Der Blutausstrich gibt Aufschluss über die Erythrozytenmorphologie, wie z. B. Polychromasie, Geldrollenbildung, basophile Tüpfelung, Targetzellen oder »Zigarren-Formen«.

Ebenfalls aus dem Vollblut zu bestimmen ist das *ZPP (Zink-Protoporphyrin)*. Wenn rote Blutzellen eisendefizient werden, nehmen sie vermehrt Zink auf und der ZPP-Spiegel ist erhöht.

Serum-Eisen kommt im Körper nur proteingebunden vor und unterliegt starken intra-individuellen Schwankungen und ist weder ein sensitiver noch ein spezifischer Marker zur Untersuchung des Eisenstatus.

Die *Transferrin*-Bestimmung erfolgt turbidimetrisch oder mittels Nephelometrie. Der ermittelte Transferrinwert ist bei Eisenmangel erhöht. Da es sich um ein negatives Akut-Phase-Protein handelt, kann es bei Entzündungen erniedrigt sein. Mittlerweile sind Serumeisen- und Transferrinbestimmungen weitestgehend durch die aussagekräftigere Serumferritin-Analyse ersetzt worden.

Das Eisenspeicherprotein *Ferritin* reflektiert den Status der Eisenspeicher. Dabei zeigen Werte $< 12 - 15 \mu\text{g/L}$ leere Eisenspeicher an. Es sind unterschiedliche international standardisierte Testkits (Immunoassays) verfügbar, die jedoch leider bei hohen Konzentrationen untereinander nur mäßig korrelieren. Die Bestimmung von Ferritin ist speziell geeignet zur Beurteilung weniger komplizierter Fälle von Eisenmangel, sowie zum Monitoring einer Eisenüberladung.

Da Ferritin ein Akut-Phase-Protein ist, muss man die Aussage der Ergebnisse differenziert betrachten. Sobald eine Entzündung vorliegt, ist Ferritin erhöht und erlaubt somit keine eindeutige Diagnostik. Außerdem kommt es wegen der überwiegend hepatischen Produktion des Ferritins bei Leberschäden häufig zu einem Anstieg der Ferritinkonzentration im Serum, z. B. bei Lebertumoren, Lebermetastasen, Hepatitis, sowie toxischen Einflüssen (z. B. Alkohol oder Medikamente).

Der lösliche Transferrinrezeptor (sTfR) bleibt von Entzündungen weitgehend unbeeinflusst und hat somit auf den ersten Blick einen Vorteil gegenüber dem Ferritin und Transferrin. Seine Bestimmung erfolgt wiederum turbidimetrisch oder nephelometrisch. Das Referenzintervall ist extrem vom verwendeten Testkit abhängig. Dies ist auf die unzureichende Standardisierung der Methode zurückzuführen. Der lösliche Transferrinrezeptor (sTfR) ist allerdings erst bei einer deutlichen Einschränkung der Erythropoese (Stadium 2) oder bei einer gesteigerten Erythropoese, wie man sie z. B. bei einem myeloproliferativen Syndrom finden kann, erhöht.

Bei der Diagnostik von Eisenmangelzuständen ist zu berücksichtigen, dass das Vorliegen bzw. der Schweregrad einer Entzündung mit erfasst wird. Dies kann durch CRP, BSG oder die Bestimmung der unreifen Granulozyten (SYSMEX XT-IG MASTER) erfolgen.

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass der »Goldstandard« zur Bestimmung der Eisenspeicher nach wie vor der Knochenmarkausstrich und die Eisen-Färbung (Berliner-Blau-Reaktion, BBR) ist.

Um die Sensitivität zu verbessern, wurden in den 90er Jahren verschiedene Indizes entwickelt, die den sTfR- und Ferritin-Wert kombinieren. Der Wichtigste ist:

$$\text{sTfR-F-Index} = \text{sTfR} / \log \text{ Ferritin}$$

Je höher der Indexwert ist, desto erschöpfter sind die Eisenspeicher. Ein erhöhter Index spiegelt einen Eisenmangel besser wider als alle bisher besprochenen Parameter.

Retikulozytenparameter sind am besten geeignet, um einen funktionellen Eisenmangel zu erkennen

Der Hämoglobin-Gehalt der reifen Blutzellen wird als Bestandteil des Blutbildes ermittelt. Er ist ein Wert, der aus einer Erythrozytenmasse mit einem durchschnittlichen Lebensalter von 120 Tagen gebildet wird.

Die Retikulozyten sind die Vorläufer der Erythrozyten und reifen ca. 3 Tage im Knochenmark und werden dann in die Blutbahn ausgestoßen. Dort angekommen, entwickeln sie sich innerhalb von 1 – 2 Tagen zu Erythrozyten. Das Vorhandensein von Retikulozyten spiegelt die erythropoetische Aktivität des Knochenmarks am besten wider. Zu beachten ist, dass die Messung der Retikulozytenzahl lediglich ein quantitatives Merkmal ist und noch nichts über deren Qualität, sprich den Hämoglobin-Gehalt der neuen Erythrozyten-Generation, aussagt.

Jetzt bietet SYSMEX für den XT-2000i auch einen qualitativen Parameter der Erythropoese an: RET-H_e. Mit der Messung von RET-H_e am SYSMEX XT-2000i wird angegeben, wie hoch der Hämoglobin-Gehalt in den Retikulozyten ist (Referenzbereich: 28 – 35 pg). So bekommt der behandelnde Arzt eine sehr zeitnahe und aktuelle Information über die Eisenversorgung der Erythropoese. Therapien können schnell beurteilt oder angepasst werden, was den RET-H_e-Parameter zu einem aussagekräftigen Monitoring-Parameter in der Routineanalytik macht.

Die Therapie von Eisenmangelzuständen ist von dessen Ursache und dem Ansprechen der Therapie beim Patienten abhängig. Verschiedene Therapie-Möglichkeiten stehen zur Auswahl, wie die orale Eisengabe, die Gabe von Erythropoetin oder die Gabe einer Kombination von Eisen i.v. und Erythropoetin. Insbesondere bei der Therapie mit Erythropoetin, einem sehr teuren Medikament, ist es von Vorteil, wenn ein erfolgreicher Therapieverlauf frühestmöglich erkennbar wäre.

Eine gute Hilfestellung hierbei bietet das sogenannte »Thomas-Diagramm«. [1] Hier werden die Eisenmangelzustände mit Unterstützung des sTfR-F-Index (siehe oben) und dem Parameter RET-H_e in vier Quadranten eingeteilt. Mit dem Retikulozyten-Hämoglobin (Indikator für den Eisenbedarf der Erythropoese) und mit dem sTfR-F-Index (Marker für die Eisenzufuhr) kann der Eisenspeicher auch bei einer akuten oder chronischen Entzündung spezifischer beurteilt werden. Zudem gibt jeder Quadrant eine Therapieempfehlung an.

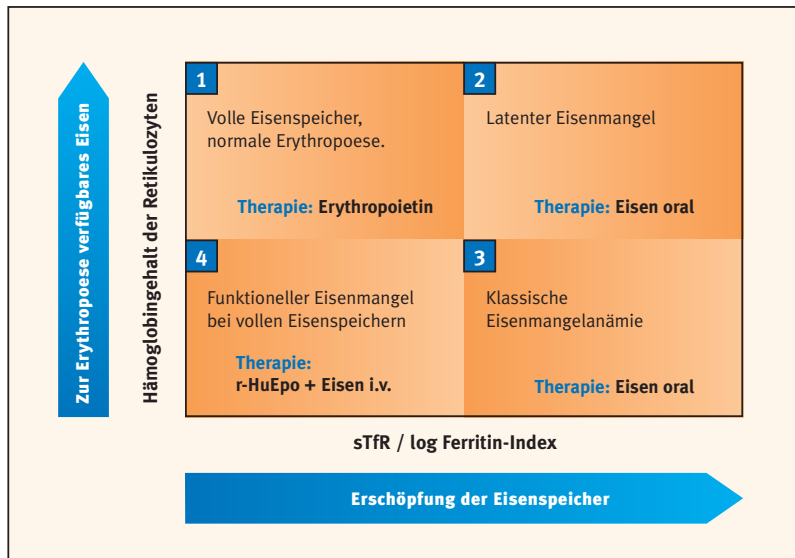


Abb. 1 Thomas-Diagramm [1, 2]

In *Quadrant 1* sind die Speichereisenreserven und die Erythropoese normal (normochrome normozytäre Anämie). Es liegt keine Störung des Eisenstoffwechsels bei Anämie vor. 80% der Patienten mit Anämie chronischer Erkrankungen oder terminalem Nierenversagen weisen, überwiegend durch eine inadäquate Erythropoetin-Synthese, eine verminderte Erythropoese auf.

In *Quadrant 2* sind die Eisenspeicher bereits entleert, aber es findet noch eine ausreichende Eisenversorgung der Erythropoese statt.

In *Quadrant 3* sind Speichereisen und Funktionseisen vermindert, so dass die Erythrozyten ungenügend mit Eisen befüllt werden. Hier ist der klassische Eisenmangel zu finden.

In *Quadrant 4* steht das Eisen trotz gefüllter Eisenspeicher aufgrund eines funktionellen Eisenmangels, z. B. bei chronischen Entzündungen, für die Erythropoese nicht zur Verfügung. Ein solcher funktioneller Eisenmangel bei gefülltem Speicher entsteht bei 20% aller Patienten mit Anämie chronischer Erkrankungen.

Wie wird der Parameter $RET-H_e$ am **SYSMEX XT-2000i** bestimmt?

Die Bestimmung von $RET-H_e$ erfolgt im Retikulozyten-Messkanal (Fluoreszenz-Durchflusszytometrie). Nach Anfärbung sind die Retikulozyten in einem definierten Bereich des Scattergramms (Fluoreszenz gegen Vorwärtsstreulicht) zu finden. $RET-H_e$ wird aus dem Vorwärtsstreulicht der Retikulozyten ($RET-Y$) berechnet. $RET-H_e$ = Reticulocyte Haemoglobin Equivalent.

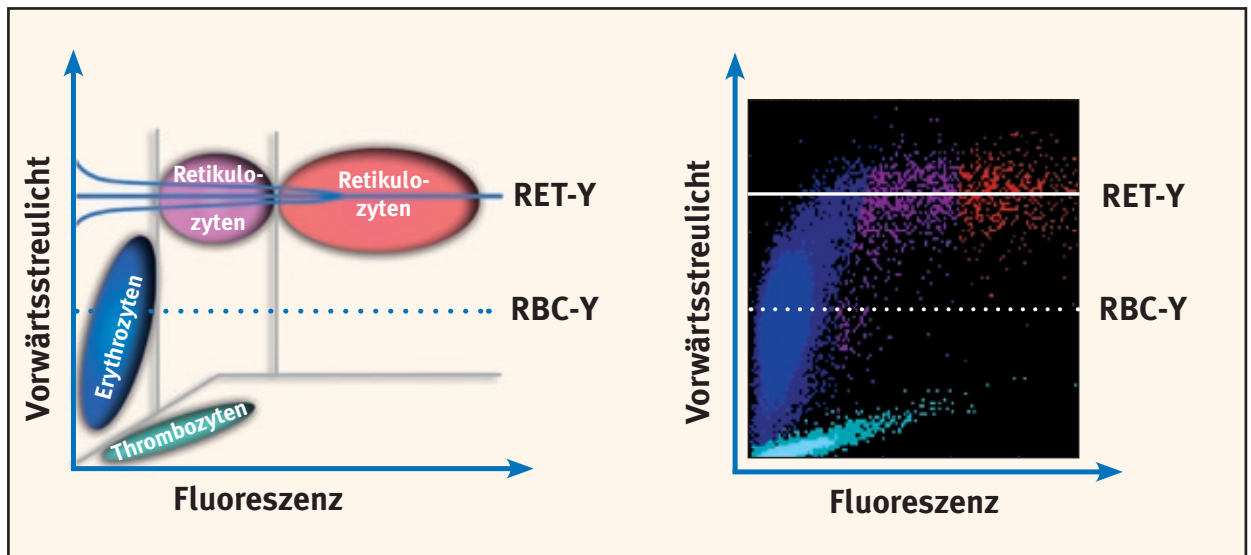


Abb. 2 Bestimmung von $RET-Y$ und $RBC-Y$ am **XT-2000i**

- $RET-Y$ ist der Mittelwert des Vorwärtsstreulichts der Retikulozyten.
 $RBC-Y$ ist der Mittelwert des Vorwärtsstreulichts der Erythrozyten.
- $RET-Y$ und $RBC-Y$ sind dimensionslose »Kanalangaben«.

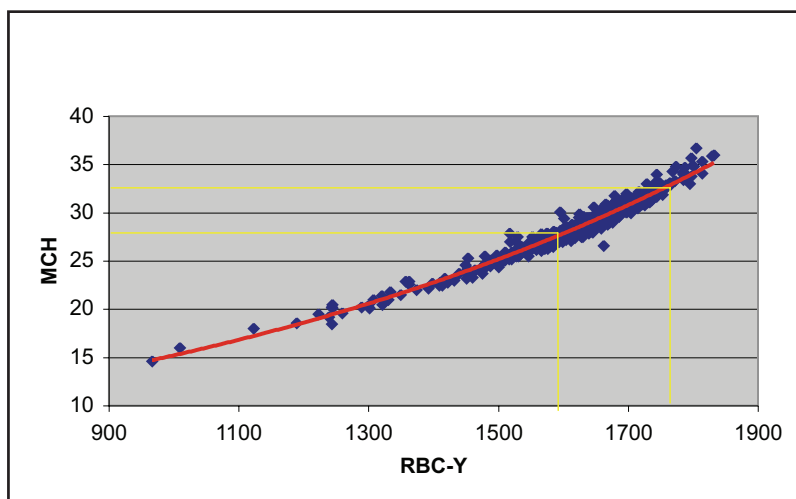


Abb. 3 Korrelation von MCH mit $RBC-Y$ [3]

Das MCH korreliert sehr gut mit dem Mittelwert des Vorwärtsstreulichts der Erythrozyten ($RBC-Y$). Ganz analog kann $RET-H_e$ daher aus dem Mittelwert des Vorwärtsstreulichts der Retikulozyten ($RET-Y$) berechnet werden.

Befundbeispiel

Ein Patient mit einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung hat eine hypochrome Anämie entwickelt. Der Eisenmangel könnte durch immer wieder auftretende Blutungen bedingt sein oder auf eine ungenügende Eisenresorption zurückzuführen sein. Es muss geklärt werden, ob der Patient durch seine chronische Entzündung zusätzlich einen funktionellen Eisenmangel entwickelt hat.

Aufgrund der Entzündung ist die Unterscheidung zwischen klassischem oder funktionellem Eisenmangel mit den herkömmlichen Methoden (Ferritin im Serum) jedoch nicht eindeutig. Beim Vorliegen einer Entzündung (CRP, BSG erhöht) liefert eine normale oder erhöhte Ferritinkonzentration keine Aussage darüber, ob Eisen für die Hämoglobinsynthese zur Verfügung steht.

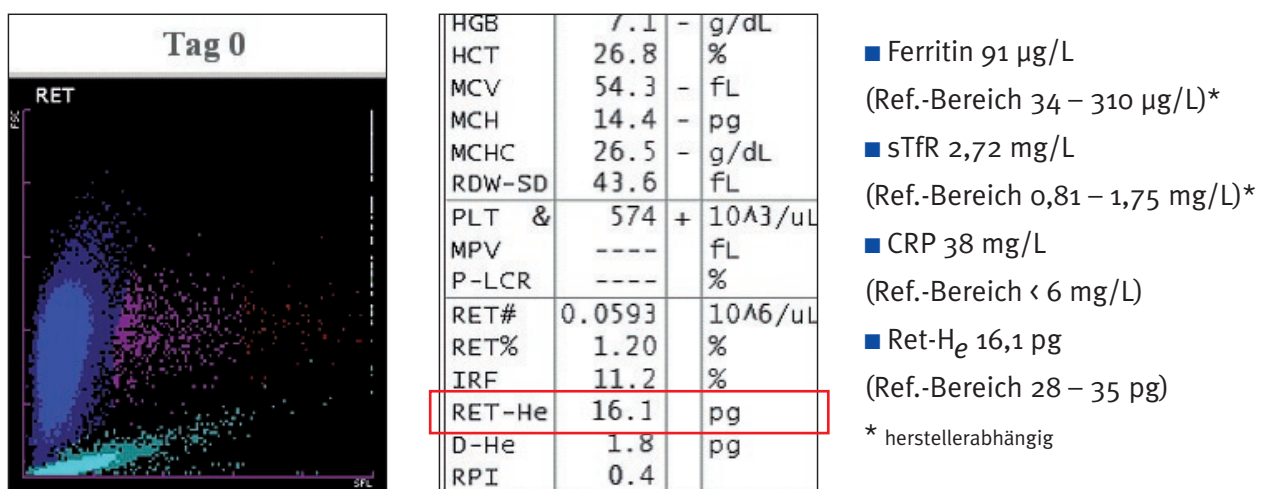


Abb. 4 Werte am Tag der Aufnahme

Mit den gemessenen Werten wurde der sTfR-Ferritin-Index berechnet und in das »Thomas-Diagramm« eingetragen. Der Patient liegt in Quadrant 3. Ein funktioneller Eisenmangel konnte ausgeschlossen werden.

Die Therapie wurde in diesem Fall mit intravenöser Eisensubstitution durchgeführt, da es durch die entzündliche Darmerkrankung zu einer gestörten oder unzureichenden Eisenaufnahme kommen kann.

Bereits am dritten Tag nach Therapiebeginn war ein deutlicher Anstieg des Parameters RET-He_e festzustellen, während die Parameter des klassischen Blutbildes wenige oder gar keine Veränderungen zeigten. Da der Hämoglobingehalt der Retikulozyten, also RET-He_e, die aktuelle Eisenversorgung der Erythropoese im Knochenmark widerspiegelt, ist der Erfolg der Therapie schnell zu erkennen.

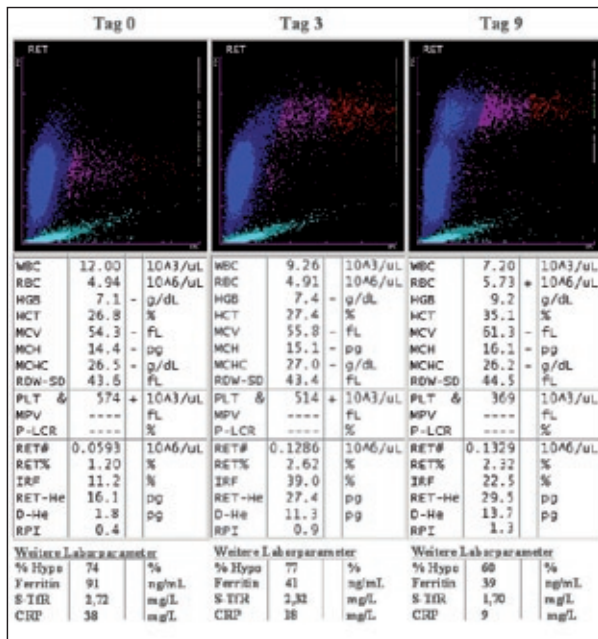


Abb. 5a Konventionelle Einheiten

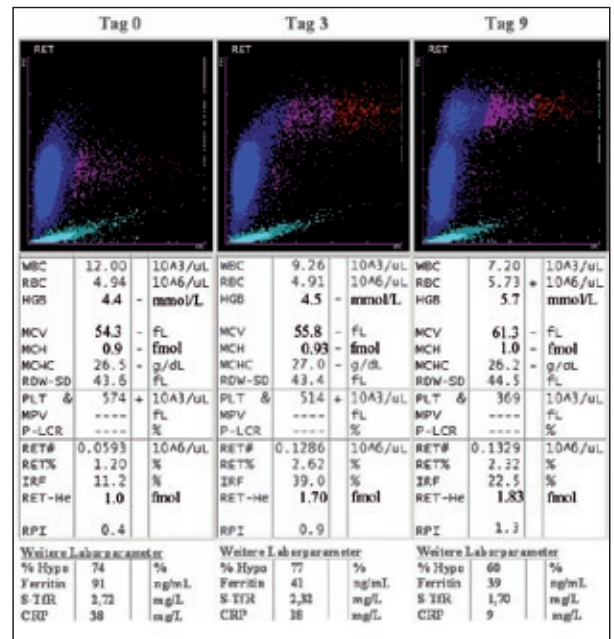


Abb. 5b SI-Einheiten

Zusammenfassung

- Mit dem RET-MASTER für den SYSMEX XT-2000i ist die Bestimmung des Hämoglobingehalts der Retikulozyten möglich.
- Die Messung erfolgt aus Vollblut im Retikulozyten-Messkanal.
- Mit diesem Parameter steht dem Labor eine kostengünstige und routinetaugliche Methode 24 Stunden am Tag zur Verfügung.
- Der RET-H_e Referenzbereich ist 28 – 35 pg.
- RET-H_e zeigt die aktuelle Eisenversorgung der Erythropese an und ist ein Maß für die Qualität der Erythropese.
- RET-H_e wird nicht von Entzündungsprozessen beeinflusst (kein Akut-Phase-Parameter).
- RET-H_e ist ein wichtiges Hilfsmittel bei der Diagnose und dem Monitoring von Eisenmangelzuständen (»Thomas-Diagramm«).
- Die klassischen Serumtests können keinen funktionellen Eisenmangel aufdecken.

Literaturangaben

- [1] Thomas C, Thomas L: *Biochemical Markers and Hematologic Indices in the Diagnosis of Functional Iron Deficiency.*
Clin Chem 2002; 48:1066
- [2] Thomas C, Thomas L, Heimpel H: *Neue Parameter zur Diagnostik von Eisenmangelzuständen.*
Deutsches Ärzteblatt 2005, 102 (9): A580
<http://www.aerzteblatt.de/v4/archiv/pdf.asp?id=45682>
- [3] Franck S, Linssen J, Messinger M, Thomas L: *Potential utility of RET-Y in the diagnosis of iron-restricted erythropoiesis.*
Clin Chem 2004, 50:1240
- [4] Hinzmann R: *Iron metabolism, iron deficiency and anaemia – from diagnosis to treatment and monitoring.* *Sysmex J Int* 2003, 13:65
- [5] Briggs C, Rogers R, Thompson B, Machin S J: *New Red Cell Parameters on the SYSMEX XE-2100 as Potential Markers of Functional Iron Deficiency.* *Sysmex J Int* Vol.11 No.2, 2001
- [6] Schaefer M: *Bestimmung des Eisenstatus, Sysmex Xtra Themenblatt 05/2001*