

Testdurchführung Reti-TIC

Anleitung zur semiquantitativen visuellen mikroskopischen Zählung der Retikulozyten

Einleitung:

Beim Vorliegen einer Anämie ist eine Klassifikation in Bezug auf die Pathogenese für das weitere Vorgehen unabdingbar. Man unterscheidet regenerative Anämien auf Grund eines erhöhten Umsatzes der Erythrozyten von nicht-regenerativen Anämien auf Grund einer Bildungsstörung. Regenerative Anämie weisen im Ausstrich vermehrt jugendliche, unreife Erythrozyten, sogenannte Retikulozyten auf.

Akute Blutungsanämien sind durch den gleichzeitigen Plasmaverlust zunächst maskiert. Erst nach Kompensation des Volumenverlustes durch extravasale Flüssigkeit wird eine Erniedrigung des Hämatokrits, der Erythrozytenzahl und der Hämoglobinkonzentration ersichtlich. Oben genanntes gilt ebenfalls für dehydrierte Tiere, da die Dehydratation zunächst das Ausmaß der Anämie verschleiert.

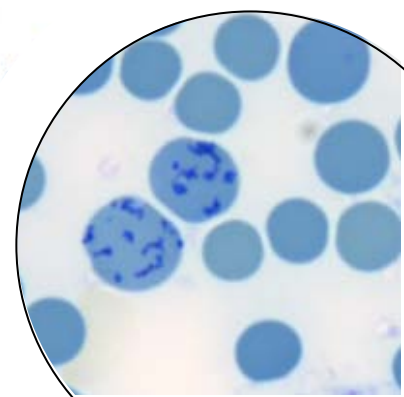
Bei einer akuten Blutungsanämie werden erste Regenerationsanzeichen erst 3-4 Tage nach der Blutung sichtbar, da die Durchreifung der erythroiden Vorläufer zum Retikulozyten ca. 4 Tage beträgt. Akute Blutungsanämien erscheinen somit zunächst nicht-regenerativ (prä-regenerative Anämie).

Retikulozyten enthalten noch Zellorganellen sowie RNS-Reste. Letztere lassen sich durch Supravitalfärbungen mit Brilliantkresylblau oder Neumethylenblau anfärben. Die Erythrozyten müssen hierfür frisch und unfixiert sein.

Es gibt vier Entwicklungsstadien der Retikulozyten:

- 1 Stadium: die RNS-Reste liegen in Knäulform vor
- 2 Stadium: die RNS-Reste liegen in einer unvollständigen Netzform vor
- 3 Stadium: die RNS-Reste liegen in einer vollständigen Netzform
- 4 Stadium: die RNS-Reste in Körnchenform vor

Im peripheren Blut sind zumeist nur die letzten beiden Stadien sichtbar. Die Brilliantkresylblau-Färbung dringt durch die Erythrozytenmembran ein und führt zu einer Verklumpung (Netzform oder retikulierte Retikulozyten) oder Präzipitation (Körnchenform oder punktierte Retikulozyten mit 2-6 kleinen Körnchen) der RNS-Reste. Die Erythrozyten nehmen eine bläulich-grünliche Färbung an, die RNS-Reste stellen sich dunkelblau dar. Im Falle einer gesteigerten Erythropoese werden größere, unreifere Retikulozyten in den Blutstrom abgegeben. Retikulierte Retikulozyten färben sich auf Grund des RNS-Gehaltes in der Pappenheim-Färbung leicht bläulich an.

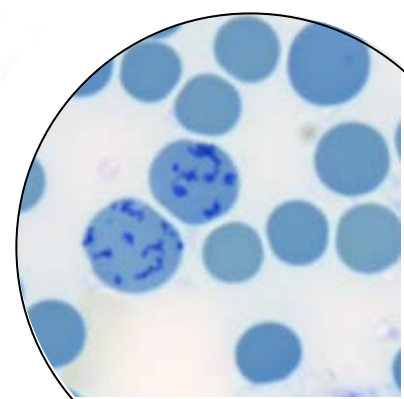


Speziesspezifische Besonderheiten:

Bei einigen Spezies (Hund, Katze, Nager, Kaninchen, Schwein, Meerschweinchen) sind auf Grund des natürlichen Umsatzes an Erythrozyten auch bei gesunden Tieren Retikulozyten in geringer Zahl im peripheren Blut nachweisbar. Bei anderen Spezies (Rind, Ziege, Schaf) sind Retikulozyten nur im Fall einer vermehrten Regeneration sichtbar. Pferde weisen auch bei einer gesteigerten Erythropoese in der Regel keine Retikulozyten im peripheren Blut auf. Bei dieser Tierart findet die Ausreifung der Retikulozyten fast ausschließlich im Knochenmark statt.

Bei der Katze können die punktierten Retikulozyten noch 2-3 Wochen nach einem Blutverlust nachweisbar sein, da feline Retikulozyten eine längere Ausreifungszeit benötigen. Retikulierte Retikulozyten treten bei der Katze mitunter erst bei schweren Anämien in Erscheinung. Diese Spezies weist im Vergleich zum Hund eine schwächer ausgeprägte maximale Regeneration auf. Die maximale Retikulozytenzahl wird bei der Katze 4-8 Tage, bei anderen Spezies 7-10 Tage nach Beginn der Anämie erwartet. Nach 10-14 Tagen nimmt die Zahl der feline Retikulozyten wieder ab, dafür können vermehrt makrozytäre hypochrome Erythrozyten beobachtet werden.

Auf Grund der längeren Verweildauer der punktierten Retikulozyten bei der Katze, spricht das Vorhandensein vieler punktierter aber weniger bis keiner retikulierter Retikulozyten für einen späten Zeitpunkt im Verlauf der Erkrankung, eine hohe Anzahl retikulierter Retikulozyten für eine frühe Phase der Anämie. Die retikulierten Retikulozyten reifen innerhalb von 12h zu punktierten Retikulozyten. Da diese von automatisierten Hämatologiegeräten auf Grund des geringen RNS-Gehaltes nicht erkannt werden, ist bei dieser Spezies zur sicheren Diagnosestellung eine Ausstrichbeurteilung notwendig, da die Anämie sonst unter Umständen falsch als nicht regenerativ eingestuft wird.



Durchführung:

Die Reti-TICs sind bereits gebrauchsfertig und enthalten 100 µl Brilliantkresylblau.

1. 100 µl EDTA-Vollblut in das Reti-TIC Gefäß pipettieren
2. Probe und Brilliantkresylblau gut mischen (Aufziehen / Abgeben)
3. Probengemisch bei Raumtemperatur inkubieren
 - 10 Minuten (Hund)
 - 15-20 Minuten (Katze)
4. Probe gut mischen
5. Blutausstrich anfertigen (Achtung: dünner Ausstrich)
6. Blutausstrich lufttrocknen
7. Blutausstrich mit dem 100x Ölimmersionsobjektiv mäanderförmig durchmustern
8. 1000 Erythrozyten auszählen und den Anteil an Retikulozyten in Prozent ermitteln

Da bei einer Anämie die Anzahl der Erythrozyten jedoch vermindert ist, sollte die Anzahl an Retikulozyten in Absolutzahlen umgerechnet werden, da sonst deren Anzahl eventuell überschätzt wird.

$$\text{Retikulozyten}_{\text{absolut}}/\mu\text{l} = \frac{\% \text{ Retikulozyten} \times \text{Erythrozyten}/\mu\text{l}}{100}$$

Alternativ kann auch ein korrigierter prozentualer Retikulozytenanteil berechnet werden:

$$\text{Korrigierte Retikulozyten}_{\text{prozentual}} = \text{Retikulozyten}_{\text{prozentual}} \times \frac{\text{Hämatokrit Patient}}{\text{mittlerer Hämatokrit}}$$

Beispiel:

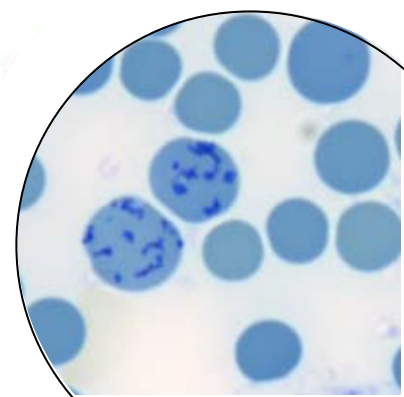
Patient Susi hat $4,08 \times 10^6/\mu\text{l}$ RBC = 4 080 000 RBC/ μl , 12 Retis pro 1000 RBCs gezählt

→ 1000 RBCs = 100%

$$12 \text{ Retis} = ? \% \rightarrow \frac{12 \text{ Retikulozyten} \times 100}{1000} = \text{Retikulozyten}_{\text{prozentual}} 1,2\%$$

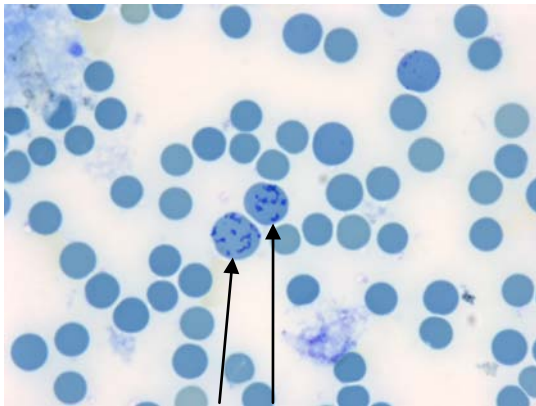
Retikulozyten_{absolut} =

$$\frac{1,2 \text{ Retis} \% \times 4\,080\,000 \text{ RBC}/\mu\text{l}}{100} = 48\,960 \text{ Retis}/\mu\text{l} = \underline{48,96 \times 10^3/\mu\text{l}}$$

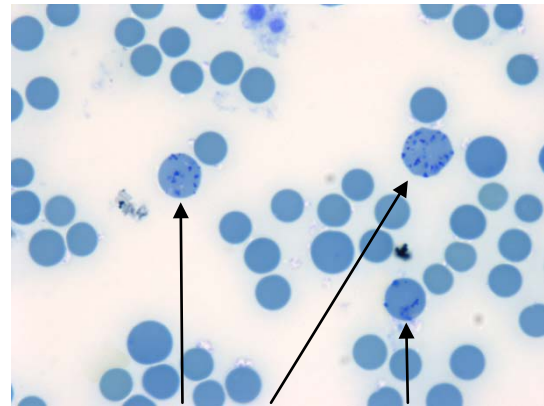


Ergebnisinterpretation:

Hund mit regenerativer Anämie:

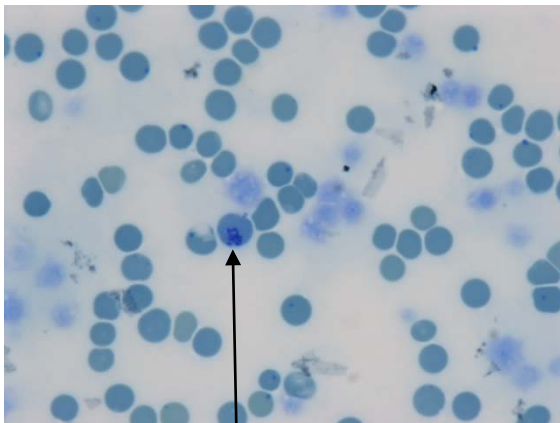


Retikulozyten

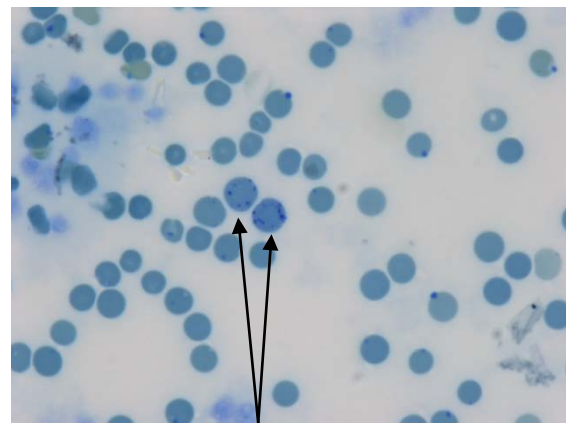


Retikulozyten

Katze mit regenerativer Anämie:

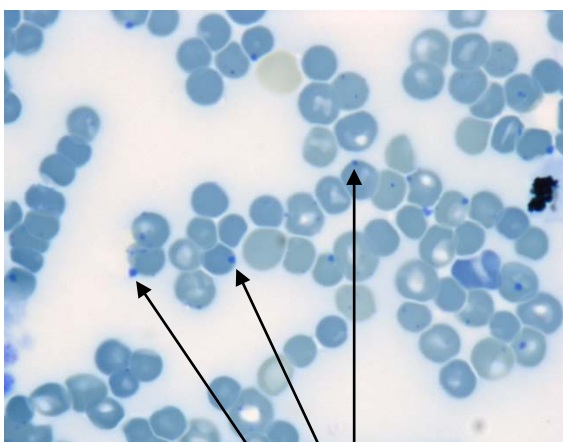


Retikulierter Retikulozyt

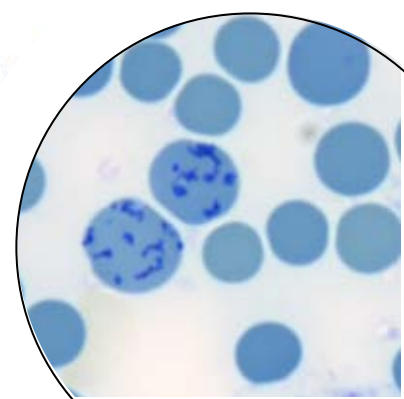


punktierter Retikulozyt

Katze mit Heinz Körperchen:



Heinz-Körperchen



Retikulozyten Referenzwerte:

Ausmaß der Regeneration	Hund	Katze	
		Retikulierte Retis	Punktierte Retis
keine	$60 \times 10^3/\mu\text{l}$	$< 15 \times 10^3/\mu\text{l}$	$< 200 \times 10^3/\mu\text{l}$
schwach	$150 \times 10^3/\mu\text{l}$	$50 \times 10^3/\mu\text{l}$	$500 \times 10^3/\mu\text{l}$
mittel	$300 \times 10^3/\mu\text{l}$	$100 \times 10^3/\mu\text{l}$	$1000 \times 10^3/\mu\text{l}$
Stark	$> 500 \times 10^3/\mu\text{l}$	$> 200 \times 10^3/\mu\text{l}$	$> 1500 \times 10^3/\mu\text{l}$

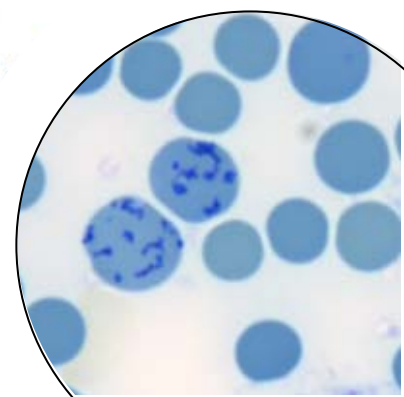
Quelle: Schalm's Veterinary Hematology 6th Edition; Douglas J. Weiss, K. Jane Wardrop; Wiley-Blackwell (2010)

Die Regeneration sollte dem Schweregrad der Anämie entsprechend ausgeprägt sein.

Klassifikation der Anämie anhand des Hämatokrits:

Klassifikation	Hund	Katze	Pferd	Rind
geringgradig	30 – 37 %	20 – 26 %	30 – 33 %	20 – 26 %
mittelgradig	20 – 29 %	14 – 19 %	20 – 29 %	14 – 19 %
hochgradig	13 – 19 %	10 – 13 %	13 – 19 %	10 – 13 %
höchstgradig	$< 13 \%$	$< 10 \%$	$< 13 \%$	$< 10 \%$

Quelle: Schalm's Veterinary Hematology 6th Edition; Douglas J. Weiss, K. Jane Wardrop; Wiley-Blackwell (2010)



Heinz-Körperchen:

In der Brilliantkresylblau-Färbung können zudem Erythrozyten mit Heinz-Körperchen identifiziert werden. Heinz-Körperchen sind Aggregate aus denaturiertem Hämoglobin. Diese entstehen auf Grund von oxidativem Stress. Vor allem die Katze neigt zur Bildung von Heinz-Körperchen. Desweiteren ist die Milz der Katze verglichen mit denen anderer Spezies nicht so effektiv in der Beseitigung von Erythrozyten mit Heinz-Körperchen. Aus diesen Gründen können auch bei gesunden Tieren bis zu 5% Heinz-Körperchen beobachtet werden.

Die entsprechenden Erythrozyten sind nicht mehr in der Lage Sauerstoff zu transportieren. Somit kann bei einer entsprechenden Menge an Erythrozyten mit Heinz-Körperchen die Sauerstoffversorgung im peripheren Gewebe auch bei normalem Hämatokrit stark eingeschränkt sein.

Erkrankungen, Medikamente und Toxine, die zur Heinz-Körperchen Bildung führen können:

Hund	Katze	Pferd	Rind
- Acetaminophen	- Acetaminophen	- Phenothiazin	- Brassicaceae Arten
- Naphthalen	- Propylenglykol	- Zwiebeln	- Zwiebeln
- Vitamin K	- Phenazopyridin	- Knoblauch	- Selenium Mangel
- Vit K Antagonisten	- Benzocain	- roter Ahorn	- Kupfer Mangel
- Benzocain	- Methylenblau		
- Methylenblau	- Methionin		
- Zwiebeln	- wiederholte		
- Knoblauch	Propofolgabe		
- Zink	- Zwiebeln		
- Ketoazidose	- Ketoazidose		

