

LumiCell® Reticulocyte Stain — LumiCell® Retikulozytenfärbung

Retikulozyten sind unreife Erythrozyten (rote Blutkörperchen), die im Knochenmark gebildet werden und in das periphere Blut gelangen und reifen dort zu reifen Erythrozyten heran. Eine erhöhte oder verminderte Retikulozytenzahl kann Hinweise auf eine gesteigerte oder verminderte Erythropoese liefern und ist insbesondere bei Anämien oder Knochenmarkinsuffizienz von diagnostischer Bedeutung.

Bei Säugetieren fehlen Retikulozyten und reife Erythrozyten zwar ein Zellkern, enthalten jedoch Restorganellen (Ribosomen und Mitochondrien) mit darin befindlicher RNA und DNA. Dieses Merkmal unterscheidet Retikulozyten von reifen Erythrozyten. Nukleinsäurefarbstoffe wie LumiCell® Retikulozytenfärbung detektieren die retikuläre Struktur der ribosomalen RNA (rRNA) in Retikulozyten und ermöglichen so deren visuelle Unterscheidung von reifen Erythrozyten. Die Färbung mit LumiCell® Retikulozytenfärbung erlaubt zudem die visuelle Differenzierung des Reifegrads der Retikulozyten: jüngere Zellen enthalten mehr RNA als reifere Retikulozyten mit niedrigerem RNA-Gehalt.

Prinzip der Methode

LumiCell® Retikulozytenfärbung (auch bekannt als BD Retic-Count® Reagenz) ist eine gebrauchsfertige Lösung zur Bestimmung der Retikulozytenzahl in humanem peripherem Blut. Thiazol-Orange bindet an rRNA und DNA und bildet dabei einen fluoreszierenden Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei 509 nm und einer Emission bei 532 nm. LumiCell® Retikulozytenfärbung eignet sich sowohl für die Mikroskopie als auch für die Durchflusszytometrie.

Biomaterial

Die Blutentnahme ist in EDTA-Vakuurröhrchen durchzuführen. Für optimale Ergebnisse sollte die Färbung innerhalb von 24 Stunden nach der Probenentnahme erfolgen. EDTA-antikoagulierendes kann vor der Färbung bis zu 24 Stunden bei Raumtemperatur (20–25 °C) gelagert werden.

Zusätzliche Materialien (nicht im Lieferumfang enthalten)

Phosphatgepufferte Salzlösung 1× (PBS, pH 7,2–7,4)

Färbeprozedur

1. Bereiten Sie zwei Reaktionsgefäße vor: eines für die Negativkontrolle und eines für die Testprobe.
2. Geben Sie zum Kontrollgefäß 2,5-µl EDTA-Vollblut und 0,5-ml 1× PBS. Vortexen Sie die Proben vorsichtig.
3. Geben Sie zum Probengefäß 0,5-ml LumiCell® Retikulozytenfärbung und 2,5-µl EDTA-Vollblut. Vortexen Sie die Proben vorsichtig.
4. Inkubieren Sie beide Gefäße für 30 Minuten bei Raumtemperatur (20–25 °C) lichtgeschützt.
5. Die gefärbten Proben sind anschließend bereit für die Analyse mittels Mikroskopie oder Durchflusszytometrie.

Wichtig! Die Messung muss spätestens innerhalb von 3 Stunden nach der Inkubation erfolgen. Bis dahin ist nur lichtgeschützte Lagerung der Proben zulässig. Direkt vor der Messung muss der Röhrcheninhalt erneut vorsichtig vortexiert werden.

Wichtig! Bei Verwendung eines Durchflusszytometers ist zwingend eine logarithmische Skalierung für Vorwärtsstreulicht (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) zu verwenden.

Hinweise:

- Der physiologische Referenzbereich der Retikulozytenzahl im peripheren Blut beträgt 0,9–2,1 %, wobei bei Neugeborenen unter zwei Wochen höhere Werte zu erwarten sind ^[1]. Bei Patienten mit erhöhter Retikulozytenzahl können in der ungefärbten Kontrollprobe mehr als 0,3 % positive Signale auftreten; in solchen Fällen ist der Auswertebereich am unteren Rand des Autofluoreszenzpeaks zu positionieren.
- Das Reagenz darf nicht für hämolytierte Blutproben verwendet werden.
- Makrothrombozyten (Riesenthrombozyten) können bei der Anwendung der LumiCell® Retikulozytenfärbung zu anomalen Resultaten führen. In diesen Fällen ist die Retikulozytenzahl mit einer alternativen Methode zu bestimmen.
- Als ein nukleinsäurebindender Farbstoff detektiert LumiCell® Retikulozytenfärbung DNA- und RNA-haltige Einschlüsse in Erythrozyten, wie Normoblastenkerne (NRBCs), Howell-Jolly-Körperchen, Cabot-Ringe und Malariaparasiten.
- Bei sehr hohen Retikulozytenwerten sollte eine zusätzliche Referenzmethode angewendet werden, z. B. die Auswertung eines peripheren Blutausstrichs mit Wright-Giemsa-Färbung.
- Bei Patienten mit erhöhter Leukozytenzahl (z. B. bei chronischer lymphatischer Leukämie) können Lymphozyten zusammen mit den Erythrozyten detektiert werden. In solchen Fällen sollte die Retikulozytenzahl mit einer alternativen Methode überprüft werden.
- Bei Patienten unter Erythropoetin-Therapie ist ein erhöhter Retikulozytenanteil möglich. In manchen Fällen ist zudem eine erhöhte Anzahl von Normoblasten (NRBCs) im peripheren Blut möglich, was die Beurteilung der Retikulozyten erschweren kann. Das Vorhandensein oder Fehlen von NRBCs kann durch die Untersuchung eines peripheren Blutausstrichs mit Wright-Giemsa-Färbung bestätigt werden.

[1] Williams W, Beutler E, Erslev A, Lichtman M. Hematology. 4th ed. New York: McGraw-Hill; 1990.

LumiCell® - eingetragenes Warenzeichen von Lumiprobe.

BD Retic-Count® - eingetragenes Warenzeichen von Becton, Dickinson and Company.