

Achtzehn S<sup>1,2</sup>, de Marées M<sup>1,2</sup>, Voss SC<sup>3,4</sup>, Sperlich B<sup>5</sup>, Romberg S<sup>3</sup>, Schänzer W<sup>3</sup>, Mester J<sup>1,2</sup>

# Retikulozyten: Untersuchungen zur Referenzwertermittlung und zum Vergleich unterschiedlicher Laboranalysegeräte

## *Reticulocytes: Reference Range and Comparison of Different Laboratory Devices*

<sup>1</sup>Deutsches Forschungszentrum für Leistungssport, Deutsche Sporthochschule Köln

<sup>2</sup>Institut für Trainingswissenschaft und Sportinformatik, Abteilung Leistungsphysiologie und Höhenmedizin, Deutsche Sporthochschule Köln

<sup>3</sup>Institut für Biochemie, Deutsche Sporthochschule Köln

<sup>4</sup>Aspire Academy for Sports Excellence, Doha, Qatar

<sup>5</sup>Institut für Trainingswissenschaft und Sportinformatik, Abteilung Ausdauerdiagnostik und Talentforschung, Deutsche Sporthochschule Köln

### ZUSAMMENFASSUNG

Ziele dieser Studie waren die Ermittlung von Referenzwerten für Retikulozyten [%RET] bei jungen Athleten (Alter 16,7 ± 3,5 Jahre) und der Vergleich von Messwerten verschiedener Laboranalysegeräte: Sysmex R500, Sysmex XT-2000i (beide Sysmex, Norderstedt) und ADVIA 120 (Bayer HealthCare, Fernwald). Der Einfluss geräteabhängiger Messunterschiede auf Referenzwerte sollte geprüft und vor dem Hintergrund bestehender Grenzwerte unterschiedlicher Sportverbände diskutiert werden. In einer Querschnittsuntersuchung wurden 428 Kaderathleten verschiedener Sportarten hinsichtlich %RET mit Hilfe des Sysmex R500 untersucht. Der ermittelte Referenzbereich betrug 0,60 – 1,82 %RET. In drei Vergleichsstudien wurden Blutproben an jeweils zwei verschiedenen Laborgeräten analysiert. Der Sysmex R500 diente als Referenzgerät. In den ersten beiden Studien wurden die Ergebnisse mit denen des ADVIA 120 verglichen. Sie korrelierten mit  $r = 0,61$  für die erste bzw.  $r = 0,82$  für die zweite Studie. Die Messergebnisse des ADVIA 120 lagen um 0,33 (1. Studie) bzw. 0,30 (2. Studie) für %RET höher als die des R500. Die dritte Vergleichsstudie (Referenzgerät vs. Sysmex XT-2000i) ergab für %RET einen Zusammenhang von  $r = 0,76$ . Die Ergebnisse des XT-2000i lagen um 0,21 %RET tiefer als die des Referenzgerätes. Fazit: Referenzwerte und Grenzwerte für %RET sowie Analysen zur Dopingkontrolle oder Blutprofil-Erstellung müssen mit Blick auf die verwendete Messtechnik interpretiert werden. Im Sinne von Dopingkontrollen sollte es Ziel sein, eine höchstmögliche Standardisierung zu erzielen.

**Schlüsselwörter:** Grenzwerte, Blutdopingkontrolle, Sysmex R500, ADVIA 120, Sysmex XT-2000i.

### SUMMARY

The goals of the study were: Establishment of reference values of reticulocytes [%RET] in young athletes (age 16.7 ± 3.5 yrs) and the comparison of data from three different laboratory machines Sysmex R500, Sysmex XT-2000i (both Sysmex, Norderstedt) and ADVIA 120 (Bayer HealthCare, Fernwald). Further goals were to analyze the device dependent influence on current reference values especially with the background of different threshold values of sport federations. For this purpose %RET from 428 squad athletes of different sport disciplines was measured. The determined reference range was 0.60 – 1.82 %RET. Within three comparative studies, blood samples were analyzed in two different laboratory devices. The R500 (Sysmex) functioned as reference device. In the first two studies the data were compared to the ADVIA 120 (Bayer) device. Data correlated with  $r = 0.61$  in the first and 0.82 in the second study. The data from the ADVIA 120 were 0.33 %RET (1st study) and 0.3% RET (2nd study) higher compared to R500. The third comparative study (reference device vs. Sysmex XT-2000i) showed a correlation of  $r = 0.76$  for %RET. In average, the data from XT-2000i were 0.21% RET lower compared to the reference value. Conclusion: Reference and threshold values of %RET for doping and blood-profile analysis are depending on the measurement technique. For means of doping analysis, the goal should be to achieve the highest standardization procedures.

**Key Words:** cut off limits, blood doping, Sysmex R500, ADVIA 120, Sysmex XT-2000i.

### PROBLEM- UND ZIELSTELLUNG

Im Ausdauersport ist die aerobe Energiegewinnung eine limitierende Größe und wesentlich von der Sauerstofftransportleistung des Blutes abhängig. Hierbei ist das in den Erythrozyten enthaltene Hämoglobin von besonderer Bedeutung und stellt die Grundlage für die Sauerstoffversorgung der Muskulatur dar. Die Neubildung der Erythrozyten wird in erster Linie von Erythropoietin (EPO) beeinflusst. Die adulte Erythropoese findet ausschließlich im Kno-

chenmark statt und dauert insgesamt ca. 7 Tage. Peripher zirkulierende Erythrozyten haben eine Lebensdauer von 120 Tagen. Etwa 1 % wird täglich abgebaut; jede Sekunde werden ca. zwei Millionen Zellen neu gebildet. Der Retikulozyt stellt im peripherem Blut die letzte unreife Vorstufe der Erythrozyten dar (29). Eine erhöhte Retikulozytenanzahl kann somit als Indikator für eine gesteigerte Erythropoese interpretiert werden. Sowohl auf physiologischem als auch auf manipulativen Weg lässt sich die Bildung der Erythrozyten über EPO stimulieren (1,10,17,28). Die Manipulation

durch Eigenblut hingegen kann die Erythropoese herunter regulieren und damit die Anzahl der Retikulozyten herabsetzen. Die Internationale Eisschnelllauf Union (ISU) beispielsweise hat für den prozentualen Retikulozytenanteil [%RET] einen Grenzwert festgelegt. Angelehnt an Referenzwerte (üblicherweise 95%-Konfidenzintervall einer Stichprobe, bei der davon ausgegangen wird, dass sie aus Gesunden besteht) liegt die obere Grenze bei 2,4% RET und die untere bei 0,2% RET. Das Internationale Olympische Komitee (IOC) hat erstmals 2002 mit einem oberen Grenzwert von 2,0% RET gearbeitet. Der Sinn der Grenzwerte liegt zum einen im Schutz der Sportler und zum anderen darin, Manipulationen durch Doping entgegenzuwirken (28). Bei Überschreitung der Grenzwerte sollen weitere Untersuchungen zum direkten Nachweis von rekombinantem Erythropoietin (rhEPO) aus dem Urin folgen und es drohen Sanktionen. Internationale Verbände sprachen in der Vergangenheit Schutzsperrern (Startsperrern) während der Wettkampfteilnahme und auch längerfristige Wettkampfsperrern aus, die nicht selten berufliche und persönliche Konsequenzen zur Folge hatten.

Vor diesem Hintergrund hat die Kenntnis über individuelle Variabilitäten von Biomarkern in den letzten Jahren große Bedeutung erhalten und führte zu der Einführung eines sogenannten Blutpasses. Über langjährige Blutanalysen eines Sportlers sollen Schwankungsbereiche erkannt und Aussagen zu Abweichungen vom individuellen Range eines Biomarkers ermöglicht werden (6,8,9,23,25,35). Neben biologischen Einflüssen können jedoch methodisch-abnahmebedingte Faktoren nicht nur zu einer interindividuellen sondern auch zu einer intra-individuellen Varianz der analysierten Blutparameter beitragen. Beide Quellen von Variabilitäten sind also aufgrund der erheblichen Konsequenzen für die Aktiven von großer Bedeutung (6).

Die hier vorgestellten Daten zeigen Ergebnisse aus drei Untersuchungen, bei denen Retikulozytenmessungen mit jeweils zwei unterschiedlichen Geräten durchgeführt wurden. Ziel war einerseits, zu prüfen, wie vergleichbar die Ergebnisse sind und andererseits, mögliche systematische Messabweichungen zu quantifizieren, um sie im Zusammenhang mit Grenzwerten diskutieren zu können. Zunächst werden Daten vorgestellt, die aus einer Querschnittsuntersuchung von Kaderathleten stammen, um Aussagen über deren Referenzbereich machen zu können. Mittels der Ergebnisse aus den drei Studien zum Gerätevergleich soll der Frage nachgegangen werden, wie hoch der Einfluss der angewandten Messmethode auf Referenzbereiche sein kann.

## MATERIAL UND METHODEN

### Studie zur Referenzwertermittlung

In der Querschnittsuntersuchung (QU) wurden hämatologische Parameter von 428 Kaderathleten verschiedener Sportarten (männlich: 203, Durchschnittsalter mit Standardabweichung: 17,2 ± 3,6 Jahre, Größe: 181,1 ± 10,3 cm, Gewicht: 74,0 ± 15,1 kg; weiblich: 225, Alter: 16,2 ± 3,3 Jahre, Größe: 167,7 ± 9,7 cm, Gewicht: 57,7 ± 10,7 kg) erhoben.

### Studien zum Vergleich verschiedener Geräte

Die Daten der ersten Studie (sleep-high train low = SHTL) zum Vergleich unterschiedlicher Analysegeräte wurden während einer Untersuchung zur Höhentrainingsmethode sleep-high train-low

in einer Höhenkammer gesammelt (durch Sauerstoffentzug in der Kammer wurde eine Schlafhöhe von ca. 2500 m ü. NN bei normalem Luftdruck simuliert). Es nahmen 9 männliche Probanden aus unterschiedlichen Sportarten teil (Alter: 24,0 ± 1,8 Jahre, Größe: 176,6 cm ± 3,4 cm, Gewicht: 69,0 ± 6,3 kg), deren Blutproben in den ersten zwei Wochen der Studie an zwei Geräten gemessen wurden (n = 34).

Der Datenpool (n = 120) der zweiten Vergleichsstudie (VS) stammt aus einer einjährigen Vergleichsmessung mit Proben eines von der WADA akkreditierten Institutes. Die Blutproben wurden durch die Nationale-Anti-Doping-Agentur (NADA) innerhalb ihrer Tätigkeit entnommen und für diese Studie anonymisiert, so dass keine anthropometrischen Daten vorliegen.

Die Blutproben (n = 55) der dritten Vergleichsstudie wurden während einer Interventionsstudie (IST) entnommen, bei der 5 männliche Probanden definierte intensive Trainingseinheiten (ca. 80% der maximalen individuellen Herzfrequenz auf NN) in einer Höhenkammer (simulierte Höhe: ca. 3000 m ü. NN) absolvierten (Alter: 30,0 ± 7,7 Jahre, Größe: 179,5 ± 6,7 cm, Gewicht: 72,2 ± 3,1 kg).

### Probennahme und Geräte

Die Analysen zur Referenzwertermittlung wurden mit dem Sysmex R500 (Sysmex, Norderstedt, Deutschland) durchgeführt.

In den Untersuchungen zum Vergleich verschiedener Geräte diente der Sysmex R500 als Referenzgerät. Nach Dimopoulou et al. (15) ist es ein präzises und aufgrund seiner geringen Größe sehr gut zu transportierendes Analysegerät und somit für Feldstudien und Trainingslager besonders gut geeignet. In den beiden ersten Studien wurde dem Referenzgerät der ADVIA 120 (Bayer HealthCare, Fernwald, Deutschland) gegenübergestellt und in der dritten Studie der Sysmex XT-2000i (Sysmex, Norderstedt, Deutschland). Letzteres wird von der WADA in den Blutpassprogrammen eingesetzt und ist ausschließlich für die beteiligten Laboratorien zugelassen.

Die Messmethode des Sysmex R500 zur Bestimmung der Retikulozyten basiert auf der Anfärbung der restlichen RNA der erythroiden Blutzelle mit einem Polymethin-Fluoreszenzfarbstoff. Die Blutprobe wird nach Anfärbung durchfluss-zytometrisch auf Streulichtverhalten und Fluoreszenzintensität analysiert. Der Hersteller gibt für die Präzision der Messung einen Variationskoeffizienten (VK) von ≤ 15% bei 1,0–4,0% RET an. Der ADVIA 120 färbt die zuvor aufgekugelten Zellen mit dem Chromogen Oxazin 750 und führt eine Lichtabsorbtionsmessung durch. In Abhängigkeit von ihrem RNA-Gehalt können die Zellen in 3 verschiedene Reifungsgrade unterschieden werden. Die Präzision der Messungen wird mit einem VK von 12,5% beschrieben. Der Sysmex XT-2000i zählt und differenziert mit moderner Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (Färbung der RNA der Retikulozyten mit Polymethin) mit einer angegebenen Präzision wie die des Vorgängermodells R500.

Die Funktion der Geräte wurde an jedem Messtag durch Qualitätskontrollen geprüft.

Während aller vier Studien wurde venöses Blut bei sitzender Position der Probanden entnommen und zeitnah analysiert. Die Retikulozyten werden im Folgenden ausschließlich bezogen auf ihren Anteil an Erythrozyten angegeben [%RET], obwohl alle Geräte auch die absoluten Retikulozytenzahlen einer Probe messen [RET 106/μL], diese jedoch weniger in Zusammenhang mit Grenzwerten stehen.

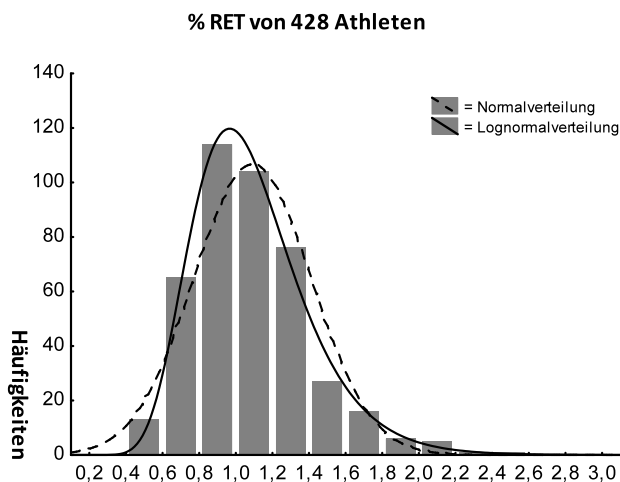


Abbildung 1: Verteilung % RET von 428 Kaderathleten (m = 203, w = 225).

**Statistik**

Für die Daten werden Mittelwert ( $\bar{x}$ ), Median, Minimum (Min), Maximum (Max) und Standardabweichung (SD) angegeben; außerdem das 95%-Konfidenzintervall ( $MW \pm 1,96 \times SD$ ). Signifikante Unterschiede der Daten zur Referenzwertermittlung wurden mit dem t-Test und der zweifaktoriellen Varianzanalyse geprüft; die der Studie zum Gerätevergleich mit dem t-Test für gepaarte Stichproben. Das Signifikanzniveau wurde für eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,05$  angesetzt. Die Ergebnisse der Vergleichsstudien werden außerdem in Regressionen mit Korrelationskoeffizienten nach Pearson (r) und Bland-Altman-Plots (BAP) dargestellt.

**ERGEBNISSE**

**Referenzwertermittlung**

Die Häufigkeitsverteilung von % RET der QU mit 428 Kaderathleten verschiedener Sportarten ist in Abb. 1 dargestellt. Für  $\bar{x}$  wurde 1,09 % RET ( $\pm 0,32$  SD) ermittelt; der Median liegt bei 1,03% RET. Der niedrigste Wert beträgt 0,45 und der höchste 2,59% RET.

Die Verteilungskurve zeigt eine für medizinische Merkmale typische Rechtsschiefe und folgt einer Lognormalverteilung. Die Ermittlung des Referenzbereiches (95% - Konfidenzintervall) wurde an den logarithmisch transformierten Daten durchgeführt. 95% der Werte liegen hiernach zwischen 0,60 – 1,82% RET.

Obwohl Referenzwerte für Retikulozyten in medizinischer Fachliteratur selten nach Geschlecht oder Alter (Ausnahme sind Werte für Säuglinge) differenziert angegeben werden (16,20,21,39), sind die in dieser Studie ermittelten Werte hinsichtlich dieser Kriterien auf signifikante Unterschiede geprüft worden. Die Werte der männlichen (n = 203,  $\bar{x}$  = 1,07%RET) und weiblichen (n = 225,  $\bar{x}$  = 1,10%RET) Athleten unterscheiden sich statistisch nicht (p = 0,41). Die Bildung der Klassen nach Alter und Geschlecht wurde von der Anzahl der Stichproben abhängig gemacht (Abb. 2). Es konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden (p = 0,74). Außerdem erfolgte die Unterscheidung nach Sportarten. Hier liegt ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied vor (p = 0,27 für geschlechtsunabhängig, wie in Abb. 2 dargestellt und p = 0,22 für geschlechtsabhängig).

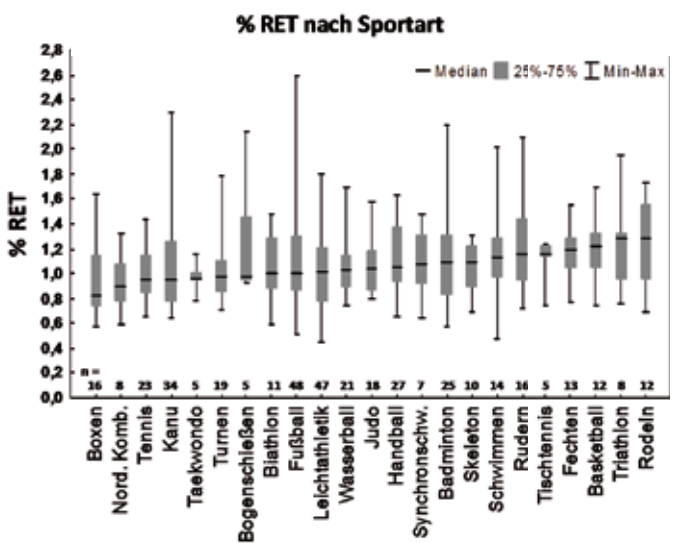
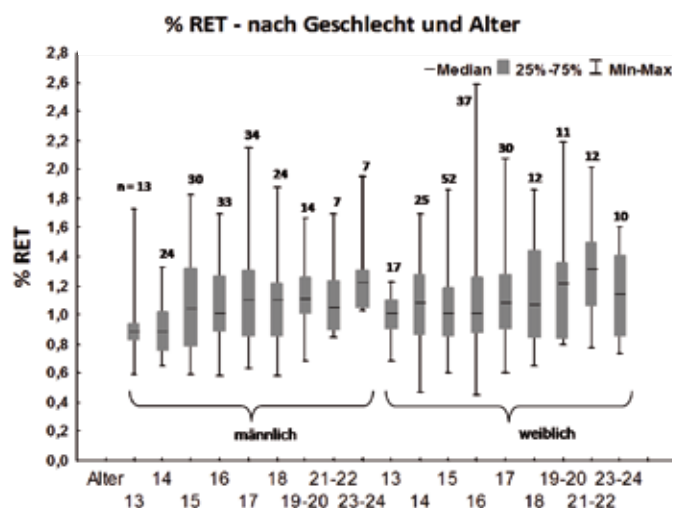
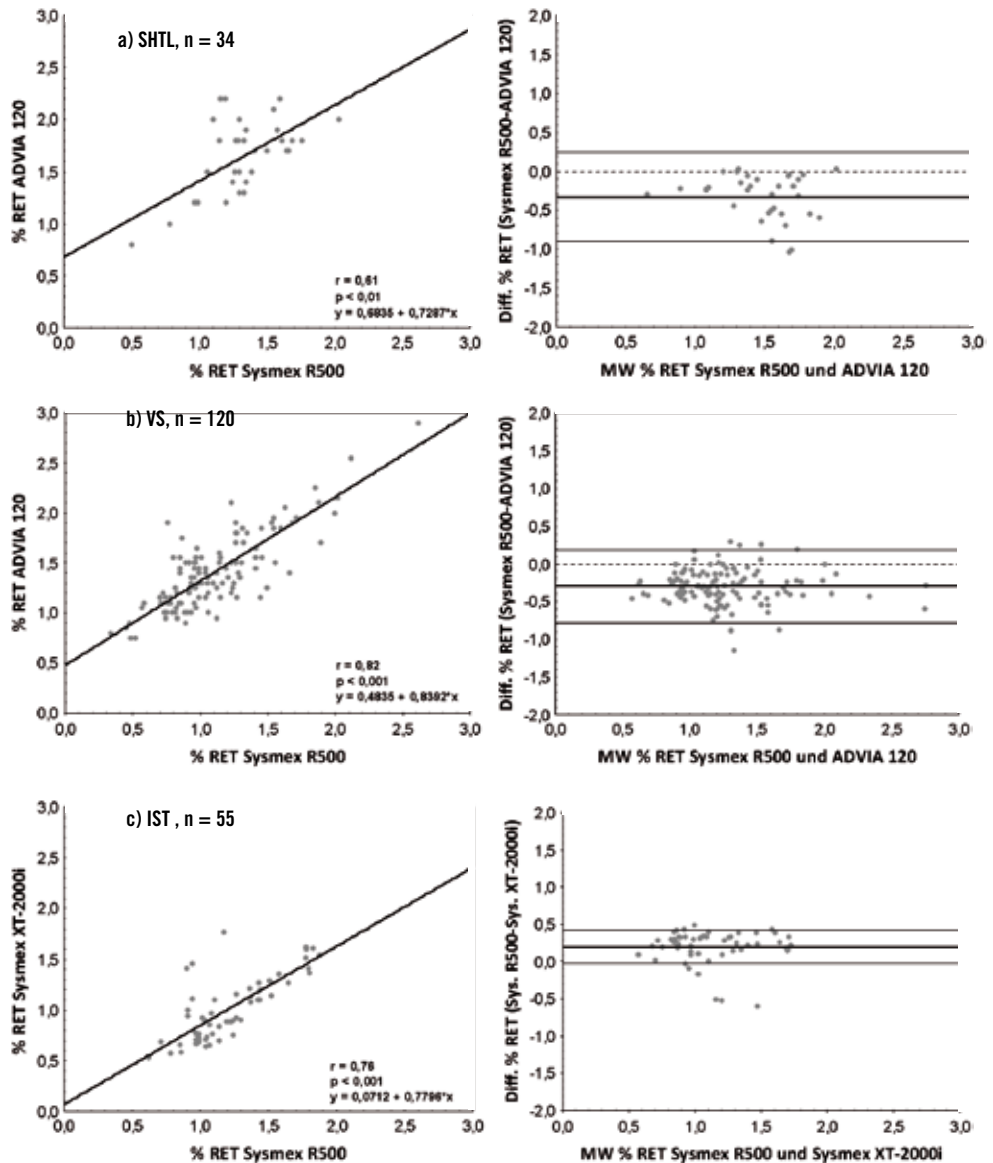


Abbildung 2: % RET im Box-Plot. Klassifiziert nach Geschlecht, Alter und nach Sportart. Dargestellt sind Median, 95% - Konfidenzintervall und Min-/Max-Werte (signifikante Unterschiede konnten statistisch nicht ermittelt werden).

**Messmethodische Variabilitäten**

Die Maße der Korrelationen und Unterschiede von % RET der drei Vergleichsstudien mit jeweils zwei verschiedenen Messgeräten sind in Abb. 3 graphisch dargestellt. Im BAP sind die absoluten Abweichungen der Ergebnisse abgebildet. Auf der x-Achse sind die gepaarten Mittelwerte einer Probe, gemessen mit zwei Geräten und auf der y-Achse deren absoluten Differenzen aufgetragen.

Für die Ergebnisse der ersten Studie SHTL zum Vergleich zweier Geräte (Sysmex R500 vs. ADVIA 120) wurde ein statistischer Zusammenhang von  $r = 0,61$  ermittelt. Im BAP ist zu erkennen, dass ein Gerät systematisch höhere Werte erzielte als das andere. Die Ergebnisse des ADVIA 120 lagen im Mittel um 0,33%RET höher als die des Sysmex R500. Das 95% -Konfidenzintervall der Differenzen verläuft von -0,90 – 0,25%RET. Die höchsten Differenzen der Graphik betragen 1,01 und 1,04%RET. Der Unterschied (Sysmex R500:  $\bar{x}$  = 1,32%RET und ADVIA 120:  $\bar{x}$  = 1,64%RET) kann als statistisch signifikant nachgewiesen werden (p = < 0,002).



**Abbildung 3:** Graphische Darstellung von % RET dreier Vergleichsstudien SHTL (a), VS (b) und IST (c). Linke Seite: Beziehung zwischen den Konzentrationen, gemessen mit zwei verschiedenen Geräten. Rechte Seite: Bland-Altman-Plot. Gezeigt wird die Beziehung zwischen Mittelwert (MW) der Ergebnisse zweier verschiedener Geräte (x-Achse) und der Differenz der mit beiden Geräten gemessenen % RET (y-Achse). Dicke Linie = Mittelwert der Differenzen (SHTL = -0,33, VS = -0,30, IST = 0,21), dünne Linie = 95% Konfidenzintervall, gestrichelte Linie = Vergleichslinie für den Fall keine Abweichungen.

Die statistische Analyse der zweiten Vergleichsstudie (VS) zeigt einen Zusammenhang von  $r = 0,82$  (Sysmex R500 vs. ADVIA 120). Im BAP kann jedoch erneut dargestellt werden, dass der ADVIA 120 systematisch höhere Messergebnisse analysierte als der Sysmex R500. Die Ergebnisse (Sysmex R500:  $\bar{x} = 1,11$  % RET und ADVIA 120:  $\bar{x} = 1,42$  % RET) sind statistisch signifikant unterschiedlich ( $p < 0,001$ ). Im Mittel liegen die Ergebnisse des ADVIA 120 um 0,30% höher als die des Sysmex R500. Das 95%-Konfidenzintervall verläuft von -0,78 – 0,18 % RET. Die in der Graphik erkennbaren Differenzen außerhalb dieses Bereiches betragen -1,15, -0,89 und -0,88% RET. Die Punktwolke weist in der Mitte die höchste Streuung auf.

Für die Daten der IST wurde ein statistischer Zusammenhang von  $r = 0,76$  ermittelt (Sysmex R500 vs. Sysmex XT-2000i). Auch hier ist graphisch ein systematischer Messunterschied erkennbar (signifikant mit  $p < 0,001$ ). Anders als beim Vergleich mit dem ADVIA 120 liegen die Ergebnisse des Referenzgerätes Sysmex R500 ( $\bar{x} = 1,22$  % RET) jedoch höher als die des Vergleichsgerätes Sysmex XT-2000i ( $\bar{x} = 1,02$  % RET). Der Mittelwert der Differenzen beträgt 0,21% RET. 95% der Differenzen liegen zwischen -0,02 – 0,42 % RET.

Die drei in der Graphik dargestellten Differenzen von -0,51 -0,52 und -0,6% RET können als Ausreißer betrachtet werden. Der Median der Differenzen liegt bei 0,25% RET.

## DISKUSSION

### Referenzwertermittlung

In der medizinischen Diagnostik und zur Interpretation von Laborwerten werden Referenzwerte herangezogen. Zur Referenzwertermittlung wird eine entsprechend große Stichprobe von humanen Proben analysiert, von denen ausgegangen wird, dass sie von Gesunden stammen. Der Bereich des 95%-Konfidenzintervalles wird als der ermittelte Referenzbereich deklariert (23,36,43). An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass der heute fast allgemeingültige Begriff Referenzwert den Begriff Normwert ersetzt hat. Hier wird indirekt deutlich, dass Blutwerte erheblichen Schwankungen durch verschiedene Einflussfaktoren unterliegen können, so dass eine Einstufung in "normal" kaum möglich ist. In medizinischer



**Tabelle 1:** Referenzbereiche, Minimum (Min), Maximum (Max), Anzahl der Proben (n) mit %RET > 2,0 %. Ergebnisse der eigenen Studie (QU) mit Sysmex R500 und hypothetische Werte für ADVIA 120 und Sysmex XT-2000i, abgeleitet von den Ergebnissen der drei Vergleichsstudien. Außerdem Korrelationskoeffizient (Pearson's), Mittelwert (MW) der Differenzen (Gerät 1 – Gerät 2) und 95 % - Konfidenzintervall der Ergebnisse von Geräte-Vergleichsstudien (SHTL, VS, IST).

Querschnittuntersuchung (QU) mit 425 Kaderathleten	Sysmex R500	ADVIA 120	Sysmex XT-2000i
Datenquelle	eigene Studie	hypothetisch	hypothetisch
Referenzbereich % RET	0,60-1,82	0,90-2,10	0,41-1,67
Min % RET	0,45	0,77	0,24
Max % RET	2,59	2,91	2,38
n > % RET 2,0	7	22	2
<b>Vergleich zweier Geräte für % RET</b>	<b>Sysmex R500 vs. ADVIA 120 (SHTL)</b>	<b>Sysmex R500 vs. ADVIA 120 (VS)</b>	<b>Sys. R500 vs. Sys. XT-2000i (IST)</b>
Korrelation (r)	0,61	0,82	0,76
MW Differenzen	-0,33	-0,3	0,21
95 % - Konfidenzi. der Diff.	-0,90 – 0,25	-0,78 – 0,18	-0,02 – 0,42
Verhältnis	Sysmex R500 < ADVIA 120	Sysmex R500 < ADVIA 120	Sys. R500 > Sys. XT-2000i

Fachliteratur sind folgende Referenzwerte, ausgehend von einer gesunden, zum Teil geschlechtsunspezifischen, Stichprobe für %RET angegeben (Angaben zu Messmethoden wie vorhanden):

- 0,8–2,0 bzw. 0,5–1,5 und 0,7–1,5 (mikroskopische Zählung (12,21,39))
- 0,5–2,0 (automatische Zählung (39))
- 0,37–1,96; 0,53–2,18 (automatische Zählung mit Fluoreszenzfarbstoff (22,37))
- 0,6–2,4 (20)
- Frauen: 0,8–4,1, Männer: 0,8–2,5 (automatische Zählung mit Fluoreszenzfarbstoffen (12,16))

Mit der hier vorgestellten Studie wurde der Frage nachgegangen, ob sich ein von den angegebenen Bereichen abweichender Referenzbereich für junge Nachwuchsathleten ermitteln lässt. Ausgehend von 95 %-Konfidenzintervall der vorliegenden Daten, kann ein von uns ermittelter Referenzwertebereich von 0,60–1,82 %RET für die Grundgesamtheit unserer Stichprobe angegeben werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie unterscheiden sich somit nicht von den oben aufgeführten Referenzbereichen. Denkbar wäre ein erhöhter Referenzbereich, da gerade bei Ausdauersportarten Erythrozyten zerstört und diese durch junge Erythrozyten ersetzt werden, wie in einer drei wöchigen Studie auf dem Fahrradergometer (5 mal pro Woche für 45 Minuten) von Schmidt et al. nachgewiesen werden konnte (32). Aber auch Banfi et al. (7) ermittelten für 106 Athleten im Alter von 19 bis 35 Jahren einen Referenzbereich von 0,30 bis 1,54 %RET ( $\bar{x}$  = 0,81). Die Kontrollgruppe aus 73 gesunden Probanden wies einen Bereich von 0,26–1,79 ( $\bar{x}$  = 0,84) %RET auf, der sich statistisch nicht von dem der Athleten unterschied. Morkeberg et al. (26) untersuchten in einer einjährigen Studie eine Fahrradmannschaft hinsichtlich ihrer hämatologischen Parameter: 374 Blutproben von 28 männlichen Probanden lagen zwischen 0,28–2,0 %RET. In der Studie von Malcovati et al. (23) wurde für 923 Fußballspieler ein Referenzbereich von 0,53–1,47 %RET ermittelt.

Innerhalb unserer untersuchten Stichprobe konnte kein Unterschied von %RET hinsichtlich der Sportarten statistisch ausgemacht werden. Dieser wäre möglicherweise z. B. zwischen Ausdauer- und Kraftsportarten durch unterschiedliche Trainingsmethoden und Anforderungen an die aerobe Leistungsfähigkeit zu erwarten.

Trainingsreize über Hypoxie oder Höhenexpositionen könnten gerade bei den Ausdauersportarten durch eine Aktivierung der Erythropoese zu höheren %RET führen. Banfi et al. (7) konnten in ihrer Untersuchung ebenfalls keinen statistischen Unterschied von %RET von Athleten verschiedener Sportarten (Rugby, Fußball, Ski Alpin) ermitteln. Ashenden et al. (3) fanden keinen Unterschied von %RET zwischen den Geschlechtern und den Sportarten Rudern und Fußball über einen mehrjährigen Untersuchungszeitraum.

Für den weiblichen Anteil der Stichprobe könnte ein vom Menstruationszyklus beeinflusster und damit altersabhängiger Anteil der Retikulozyten erwartet werden. Er deutet sich zwar graphisch an, kann jedoch nicht statistisch nachgewiesen werden, was mit den oben aufgeführten altersunabhängigen Angaben für %RET in der Literatur und mit den Ergebnissen einer Studie von Tarallo et al. übereinstimmt (38).

7 Athleten lagen mit 2,02–2,59 %RET über dem seit den Olympischen Winterspielen 2002 in Salt Lake City herangezogenen Grenzwert von 2,0 %RET. Mögliche Ursachen können sportliche Aktivität, die damit verbundene Zerstörung von Erythrozyten und Aktivierung der Erythropoese sein (31). Auch pathophysiologische Prozesse können Grund einer veränderten Erythropoese sein. In der Sportwissenschaft steht die Hypoxie als physiologischer Reiz zur Steigerung der Erythropoese und damit eine mögliche Verbesserung der aeroben Leistungsfähigkeit im Vordergrund. Das Höhentrainingslager ist für viele Ausdauersportler fester Bestandteil im Trainingsplan (44,45,46). In den letzten Jahren ist jedoch auch die Blutmanipulation unter Ausdauersportlern zu einer öffentlichen Diskussion geworden. Im Fokus stehen dabei autologe und homologe Bluttransfusionen sowie die Anwendung von rekombinantem Erythropoetin (rhEPO). Rekombinantes Erythropoetin kann seit der Entwicklung von menschlichem rhEPO nur schwer nachgewiesen werden. Um kurzfristig und vor Ort schnell Aussagen machen zu können, sind hämatologische Parameter und ihre Referenzwerte von größter Bedeutung. Ein Befund über dem in Anlehnung an Referenzwerte ermittelten Grenzwert von >2,0 %RET kann bei Olympischen Spielen zu einer weiteren Doping-Kontrolle führen, da der Verdacht einer unerlaubten EPO-Manipulation bestehen würde.

### Messmethodische Variabilitäten

Vor diesem Hintergrund ist die Kenntnis gerätetechnisch bedingter Variabilitäten von %RET unerlässlich, denn die auf dem Markt erhältlichen Messgeräte bedienen sich unterschiedlicher Messmethoden (z.B. Anfärbung der RNA in den Retikulozyten mit Vital-, Absorbti- oder Fluoreszenzfarbstoffen (11)). Auch andere Autoren machen in ihren Publikationen darauf aufmerksam, dass ihre Ergebnisse im Zusammenhang mit den Analysegeräten und ihren Messmethoden zu sehen sind (3,6,25,39). Hämatologische Analysegeräte werden hauptsächlich durch die Herstellerfirma kalibriert. Die fehlerfreie Funktion der Geräte kann durch eine laborinterne Qualitätskontrolle geprüft werden. Eine weitere Kontrollmaßnahme stellt die externe Qualitätskontrolle durch Ringversuche dar. Im Gegensatz zur internen Kontrolle, bei der Kontrollmaterial mit bekannter Konzentration zur Verfügung steht, analysiert der Anwender die externe Kontrolle ohne Kenntnis der Messwertkonzentrationen bzw. Sollwerte. Die Ergebnisse werden anschließend in Deutschland nach den Richtlinien der Bundesärztekammer (RiliBäk) von nach ISO 17 025 akkreditierten Referenzlaboratorien bewertet (z.B. DGKL und Instant e.V.). Von Bedeutung ist hier, dass ein- und demselben Ringversuch je nach Messmethode unterschiedliche Zielwerte und Referenzwerte (Bewertungsbereich) zu Grunde liegen. Unterschiedliche, messmethodisch bedingte Ergebnisse werden somit bei Ringversuchen einkalkuliert. Hier wird deutlich, dass methodische Variabilitäten von geringerer klinischer Bedeutung sind, als sie es für einen Vergleich der Daten von Athleten sein können. Gemessene Biomarker werden in der klinischen Diagnostik anhand von ausgewiesenen Referenzwerten in Abhängigkeit der Messtechnik in der Postanalytik vom Arzt bewertet. Liegt ein Messwert in der sogenannten Grauzone (Übergang vom Referenzwert zum eindeutig pathologischen Wert) können weitere Untersuchungen zur Diagnostik herangezogen oder Messungen wiederholt werden. In der Regel werden eine Reihe von Probennahmen und Analysen durchgeführt, bevor ein eindeutiger Befund zur Therapiegrundlage vorliegt. Dagegen hat bei Athleten ein einmal gemessener %RET-Wert, der oberhalb eines Grenzwertes liegt, welcher unabhängig von der Messtechnik festgelegt wurde, möglicherweise direkte Konsequenzen zur Folge.

Der Vergleich zwischen den drei Geräten zeigt unterschiedlich hohe Korrelationen (Tab. 1). Eine als unbefriedigend einzustufende Korrelation von  $r = 0,61$  für die Daten der ersten Vergleichsstudie SHTL hat vermutlich eine Summierung prä- bzw. postanalytischer Einflussfaktoren als Ursache, die jedoch nicht dokumentiert wurden (s. hierzu (19)). Systematische Messunterschiede wurden im Bland-Altman-Plot deutlich gemacht und bestätigen die Hypothese von gerätebedingten Messvariabilitäten. Folgendes kann demzufolge formuliert werden: Die Ergebnisse des ADVIA 120 lagen im Durchschnitt um 0,32%RET ( $\bar{x}$  Studie SHTL und VS) höher als die des Sysmex R500. Die Ergebnisse des Sysmex R500 lagen um 0,21 % RET höher als die des Sysmex XT-2000i. Der in unserer Studie (QU) ermittelte Referenzbereich läge mit dem ADVIA 120 höher und mit dem Sysmex XT-2000i niedriger (Tab. 1). Die Anzahl von 7 Athleten der QU mit dem Sysmex R500, die über dem Grenzwert von %RET lagen, hätte sich bei einer Messung mit einem ADVIA 120 auf 22 erhöht und mit einem Sysmex XT-2000i auf 2 Athleten reduziert (Tab. 1). Als Folge bedeutet dies, dass sich im Ernstfall die Anzahl der sofort ausgesprochenen Schutzsperrn während eines Wettkampfes erheblich unterscheiden würden.

Auch Ashenden et al. untersuchten in ihrer Studie „intra-measurement“ Variabilitäten und fanden signifikant höhere Ergebnisse mit dem ADVIA 120 als mit dem Sysmex XE-2100 (3). Publierte Daten von Morkeberg et al. stimmen in signifikant höheren Analysewerten des ADVIA 120 gegenüber dem Sysmex R500 mit unseren Ergebnissen überein (25). Butarello et al. (13) untersuchten mit fünf verschiedenen Geräten die Fraktion junger Retikulozyten (IRF) und kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass deren Referenzbereich stark methodenabhängig ist. In einer weiteren Studie von Ashenden et al. wurden Messabweichungen elf verschiedener hämatologischer Analysegeräte untersucht. Die Autoren fanden überwiegend höhere Werte mit dem ADVIA 120 als mit auf Fluoreszenzintensität basierenden Messmethoden (4). In einer anderen Studie mit 317 Probanden (männlich: 142, weiblich: 175) sollten Referenzbereiche für Retikulozyten mit fünf Messgeräten ermittelt werden. Die Arbeitsgruppe Van den Bossche et al. wiesen hier geräteabhängige Referenzbereiche für %RET aus, die auch Thomas in einer neueren Fassung seines Standardwerkes über Bewertungen von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik aufnahm (40,41): 0,61–2,16 (AbX Pentra 120 Retic); 0,61–1,79 (Coulter Gen-S); 0,44–1,55 (Sysmex SE 9500); 0,61–2,24 (Abbott CD 4000) und 0,50–1,40 (ADVIA 120).

Neben den automatischen Bestimmungsmethoden stellt die manuelle Zählmethode der Retikulozyten (Verwendung von Vitalfarbstoffen) auch heute noch eine Alternative dar. Diese Methode ist jedoch unpräziser, und weist demzufolge höhere intra- und interlabor-Variabilitäten auf (intra-VK von 10%, 23,6% und 49% für hohe, normale und niedrige %RET und inter-VK von 25–50%), als die automatische Zählmethode (14,30,39,42). Zum einen werden weitaus weniger Erythrozyten hinsichtlich der Retikulozyten beurteilt und zum anderen spielt der subjektive Aspekt eine große Rolle. Daneben können Vitalfarbstoffe auch andere Bestandteile (Eiseneinschlüsse, denaturiertes Eiweiß) der Retikulozyten anfärben (5,21). Es werden jedoch nicht grundsätzlich höhere Werte mit dem Mikroskop ermittelt oder höhere Referenzwerte angegeben (30,39). Fluorochrome färben auch DNS, jedoch konnten wir entgegen der Theorie, dass Oxazin 750 (ADVIA 120) als nicht-fluoreszierender Farbstoff nur RNA färbt, keine höheren Werte mit dem Fluoreszenzverfahren ermitteln.

Es sei darauf hingewiesen, dass an dieser Stelle nicht geklärt werden kann, welche Messmethode sich dem wahren Wert am ehesten annähert, da dies nicht Untersuchungsgegenstand war und nur mit hoch standardisierten und aufwendigen Methoden ermittelt werden kann. Die Varianz ermittelter Werte mit unterschiedlichen Messtechniken ist unter Anwendern eine bekannte Tatsache, erhält jedoch bei der Interpretation von Ergebnissen oft zu wenig Beachtung. So wäre es ratsam, beispielsweise Datenbanken von Blutprofilen unbedingt durch die Dokumentation von Messgerät und -methode zu erweitern. Allem voran steht eine unabdingbare Standardisierung nicht nur der Blutentnahme in Bezug auf Körperstellung, Tageszeit, vorhergehende Belastung und Höhenexposition, sondern auch in Bezug auf die verwendete Messapparatur (4,36). Es sind nicht nur Kenntnisse über den Einfluss von Training, den Abnahmezeitpunkt (vor, während, nach Wettkampf), die Sportart und die intraindividuellen Variabilitäten von %RET besonders wichtig, sondern auch von Präanalytik und Messmethodik (4,6,25). Aus den Ergebnissen resultiert auch, dass derzeitig definierte Blutparameter und ihre festgelegten Grenzwerte zur Ermittlung von Veränderungen hämatologischer Eigenschaften, wie auch schon von ande-

ren Autoren postuliert, nicht alleine als Indikatoren zur Ermittlung von Blutmanipulationen ausreichen (33). Neuere direkte (totale Hämoglobinmenge, eSAT) und indirekte Methoden (ON-, Off-model, z-score) tragen dazu bei, die bestehende Testbatterie effektiv zu erweitern (2, 18, 24, 27, 33, 34, 35). Die Ergebnisse unserer Studien sollen jedoch demonstrieren, dass nicht nur die Erweiterung von Testparametern und damit die weitere Offenlegung medizinischer Daten nötig ist, sondern gleichermaßen eine Durchsichtigkeit bzw. Dokumentation der Messmethodik erfolgen sollte.

## SCHLUSSFOLGERUNGEN

Der in der vorgestellten Studie ermittelte Referenzbereich für %RET für Kader-Athleten zeigt keine Abweichung von denen in gängiger medizinischer Literatur angegebenen Referenzbereichen. Es konnte jedoch erneut in drei Teilstudien nachgewiesen werden, dass von methodisch bedingten, systematischen Messvarianzen für %RET auszugehen ist. Als Folge ergeben sich drei Konsequenzen:

- Es sollte eine hohe Standardisierung der Durchführungen von Messungen zur Erfassung intraindividuelle Referenzbereiche für Retikulozyten und zur Dopingkontrolle angestrebt werden, bei der nur ein Gerätetyp zur Anwendung kommt.
- Ist die Anwendung eines Gerätetyps nicht durchführbar, ist es unumgänglich, ermittelte Messwerte nur im Zusammenhang mit Referenzbereichen, die mit derselben Methode erhoben wurden zu interpretieren.
- Grenzwerte müssen in Abhängigkeit der Messmethode definiert werden, woraus folgt, dass Proben von Athleten nur mit dieser Messmethode kontrolliert werden dürfen.

*Angaben zu finanziellen Interessen und Beziehungen, wie Patente, Honorare oder Unterstützung durch Firmen: Keine.*

## LITERATUR

1. ASHENDEN MJ, VARIET-MARIE E, LASNE F, AUDRAN M: The effects of microdose recombinant human erythropoietin regimens in athletes. *Haematologica* 91 (2006) 1143-1144.
2. ASHENDEN MJ, GORE CJ, PARISOTTO R, SHARPE K, HOPKINS WG, HAHN AG: Effect of altitude on second-generation blood tests to detect erythropoietin abuse by athletes. *Haematologica* 88 (2003) 1053-1062.
3. ASHENDEN MJ, LACOSTE A, ORHANT E, AUDRAN M, SHARPE K: Longitudinal variation of hemoglobin and reticulocytes in elite rowers. *Haematologica* 89 (2004) 1403-1404.
4. ASHENDEN MJ, SHARPE K, DAMSGAARD R, JARVIS L: Standardization of reticulocyte values in an antidoping context. *Am J Clin Pathol* 121 (2004) 816-825.
5. BAIN BJ, HUHNS D: Roche Grundkurs hämatologische Morphologie. Blackwell-Wiss.-Verl., Berlin, Wien, 1997.
6. BANFI G: Reticulocytes in sports medicine. *Sports Med* 38 (2008) 187-211.
7. BANFI G, MAURI C, MORELLI B, DI GAETANO N, MALGERI U, MELEGATI G: Reticulocyte count, mean reticulocyte volume, immature reticulocyte fraction, and mean spheroid cell volume in elite athletes: reference values and comparison with the general population. *Clin Chem Lab Med* 44 (2006) 616-622.
8. BANFI G, TAVANA R, FRESCHI M, LUNDBY C: Reticulocyte profile in top-level alpine skiers during four consecutive competitive seasons. *Eur J Appl Physiol* 109 (2010) 561-568.
9. BERGLUND B, EKBLUM B, EKBLUM E, BERGLUND L, KALLNER A, REINEBO P, LINDBERG S: The Swedish blood pass project. *Scand J Med Sci Sports* 17 (2007) 292-297.
10. BÖNING D, MAASSEN N: Wirkungsmechanismen von Erythro-poetindoping. *Dtsch Z Sportmed* 59 (2008) 175-177.
11. BRIGGS C, GRANT D, MACHIN SJ: Comparison of the automated reticulocyte counts and immature reticulocyte fraction measurements obtained with the ABX Pentra 120 Retic blood analyzer and the Sysmex XE-2100 automated hematology analyzer. *Lab Hematol* 7 (2007) 75-80.
12. BRUHN HD, FÖLSCH UR, SCHÄFER H: Labormedizin. Schattauer, Stuttgart, 2008.
13. BUTTARELLO M, BULIAN P, FARINA G, PETRIS MG, TEMPORIN V, TOFFOLO L: Five fully automated methods for performing immature reticulocyte fraction: comparison in diagnosis of bone marrow aplasia. *Am J Clin Pathol* 117 (2002) 871-879.
14. CORBERAND JX: Reticulocyte analysis using flow cytometry. *Hematol Cell Ther* 38 (1996) 487-494.
15. DIMOPOULOU HA, THEODORIDIS T, GALEA V, CHRISTOPOULOU-COKKINO V, SPYRIDAKI MH, GEORGAKOPOULOS CG: ISO/IEC 17025 Sysmex R-500 hematology reticulocyte analyzer validation. *Lab Hematol* 13 (2007) 43-48.
16. DÖRNER K: Klinische Chemie und Hämatologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2001.
17. ELLIOTT S: Erythropoiesis-stimulating agents and other methods to enhance oxygen transport. *Br J Pharmacol* 154 (2008) 529-541.
18. GORE CJ, PARISOTTO R, ASHENDEN MJ, STRAY-GUNDERSEN J, SHARPE K, HOPKINS W, EMLIE KR, HOWE C, TROUT GJ, KAZLAUSKAS R, HAHN AG: Second-generation blood tests to detect erythropoietin abuse by athletes. *Haematologica* 88 (2003) 333-344.
19. GUDER, WG, NARAYANAN, S, WISSER, H, ZAWTA, B: Diagnostic Samples: From the patient to the laboratory. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2009.
20. HALLBACH J: Klinische Chemie und Hämatologie für den Einstieg. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2006.
21. HALLMANN L: Klinische Chemie und Mikroskopie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1980.
22. KRAAIJENHAGEN RJ: Reticulocyte reference values by the Bhattacharya method: results of a pilot study. *Clin Lab Haematol* 18 Suppl 1 (1996) 15-16.
23. MALCOVATI L, PASCUTTO C, CAZZOLA M: Hematologic passport for athletes competing in endurance sports: a feasibility study. *Haematologica* 88 (2003) 570-581.
24. MORKEBERG J, BELHAGE B, ASHENDEN M, BORNO A, SHARPE K, DZIEGIEL MH, DAMSGAARD R: Screening for autologous blood transfusions. *Int J Sports Med* 30 (2009) 285-292.
25. MORKEBERG J, SALTIN B, BELHAGE B, DAMSGAARD R: Blood profiles in elite cross-country skiers: a 6-year follow-up. *Scand J Med Sci Sports* 19 (2009) 198-205.
26. MORKEBERG JS, BELHAGE B, DAMSGAARD R: Changes in blood values in elite cyclist. *Int J Sports Med* 30 (2009) 130-138.
27. PARISOTTO R, ASHENDEN MJ, GORE CJ, SHARPE K, HOPKINS W, HAHN AG: The effect of common hematologic abnormalities on the ability of blood models to detect erythropoietin abuse by athletes. *Haematologica* 88 (2003) 931-940.
28. PARISOTTO R, GORE CJ, HAHN AG, ASHENDEN MJ, OLDS TS, MARTIN DT, PYNE DB, GAWTHORN K, BRUGNARA C: Reticulocyte parameters as potential discriminators of recombinant human erythropoietin abuse in elite athletes. *Int J Sports Med* 21 (2000) 471-479.
29. PORSTMANN B: Retikulozyten. Wachholz, Nürnberg, 1993.
30. PRELOZNIK-ZUPAN I, CERNEC P, ZONTAR D: Reticulocyte analysis using light microscopy and two different flow cytometric procedures. *Pflugers Arch* 440 (2000) R185-R187.
31. ROBINSON N, SCHWEIZER C, CARDIS CH, SAUGY M, KAMBER M, SCHAT- TENBERG L, MANGIN P: Haematological and biochemical parameters form all professional cyclists during the Tour de Suisse 1999. *Schweiz Z Sportmed Sporttraumatol* 48 (2000) 104-110.

32. SCHMIDT W, MAASSEN N, TROST F, BÖNING D: Training induced effects on blood volume, erythrocyte turnover and haemoglobin oxygen binding properties. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 57 (1988) 490-498.
33. SCHMIDT W, PROMMER N, STEINACKER JM, BÖNING D: Sinn und Unsinn von hämatologischen Grenzwerten im Ausdauersport - Folgerungen aus den Dopingskandalen von Turin 2006. *Dtsch Z Sportmed* 57 (2006) 54-56.
34. SCHMIDT WFJ, HEINICKE K: Screening der totalen Hämoglobinmenge bei Triathleten und professionellen Radrennfahrern. *Dtsch Z Sportmed* 59 (2008) 146-152.
35. SHARPE K, ASHENDEN MJ, SCHUMACHER YO: A third generation approach to detect erythropoietin abuse in athletes. *Haematologica* 91 (2006) 356-363.
36. SHARPE K, HOPKINS W, EMSLIE KR, HOWE C, TROUT GJ, KAZLAUSKAS R, ASHENDEN MJ, GORE CJ, PARISOTTO R, HAHN AG: Development of reference ranges in elite athletes for markers of altered erythropoiesis. *Haematologica* 87 (2002) 1248-1257.
37. TARALLO P, HUMBERT JC, FOURNIER B, MAHASSEN P, HENNY J: Reticulocytes: reference limits. *Clin Lab Haematol* 18 Suppl 1 (1996) 13-14.
38. TARALLO P, HUMBERT JC, MAHASSEN P, FOURNIER B, HENNY J: Reticulocytes: biological variations and reference limits. *Eur J Haematol* 53 (1994) 11-15.
39. THOMAS L: Labor und Diagnose. TH-Books-Verl.-Ges., Frankfurt/Main, 2000.
40. THOMAS L: Labor und Diagnose. TH-Books-Verl. Ges., Frankfurt/Main, 2005.
41. VAN DEN BOSSCHE J, DEVREESE K, MALFAIT R, VAN D V WAUTERS A, NEEIS H, DE SCHOUWER P: Reference intervals for a complete blood count determined on different automated haematology analysers: Abx Pentra 120 Retic, Coulter Gen-S, Sysmex SE 9500, Abbott Cell Dyn 4000 and Bayer Advia 120. *Clin Chem Lab Med* 40 (2002) 69-73.
42. VAN HOUTE AJ, BARTELS PC, SCHOORL M, MULDER C: Methodology-dependent variations in reticulocyte counts using a manual and two different flow cytometric procedures. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 32 (1994) 859-863.
43. WHITLEY E, BALL J: Statistics review 2: samples and populations. *Crit Care* 6 (2002) 143-148.
44. WILBER RL: Current trends in altitude training. *Sports Med* 31 (2001) 249-265.
45. WILBER RL: Application of altitude/hypoxic training by elite athletes. *Med Sci Sports Exerc* 39 (2007) 1610-1624.
46. WILBER RL: Live high+train low: thinking in terms of an optimal hypoxic dose. *Int J Sports Physiol Perform* 2 (2007) 223-238.

**Korrespondenzadresse:****Silvia Achtehn****Deutsche Sporthochschule Köln****Institut für Trainingswissenschaft und Sportinformatik****Am Sportpark Müngersdorf 6****50933 Köln****E-Mail: [achtehn@dshs-koeln.de](mailto:achtehn@dshs-koeln.de)**