Il parametro IRF (immature reticulocyte fraction) in atleti di élite

G. Banfi[a,b], R. Graziani[c], A. Dolci[d], G. Melegati[e,f]

[a]*Direzione Sanitaria, Istituto Ortopedico Galeazzi, Milano*
[b]*Facoltà di Scienze Motorie, Milano*
[c]*Laboratorio Cedal, Gallarate (VA)*
[d]*Multimedica, Milano*
[e]*Riabilitazione dello Sport, Istituto Ortopedico Galeazzi, Milano*
[f]*Responsabile Staff Medico, Nazionale Rugby*

Premesse. L'automazione consente attualmente di ottenere agevolmente e con elevata precisione informazioni concernenti i reticolociti (conta e parametri correlati). La valutazione di tali parametri dal punto di vista fisiologico e clinico è importante, ma il loro corretto utilizzo necessita di studi dedicati. In particolare, l'IRF (immature reticulocyte fraction) che fornisce informazioni sulla maturazione dei reticolociti, può esser utile per indicare lo stato di attivazione del midollo osseo, sia nelle malattie sia in peculiari stati fisiologici, come nell'atleta.
Metodi. Lo studio dell'IRF è stato condotto con strumentazione Abbott su un grande numero di atleti di élite, appartenenti a diverse discipline.
Risultati. L'IRF medio, rilevato sugli atleti, risulta nei limiti di riferimento della popolazione generale, ma tende ad esser vicino al limite superiore, a prescindere dallo sport di appartenenza e dalla fase della stagione agonistica.
Conclusioni. L'IRF testimonia di un'attivazione costante e continua (fisiologica) del midollo osseo negli atleti di élite. La valutazione degli atleti, anche ai fini legali, mediante parametri ematologici, e in particolare dei reticolociti, deve tener conto di tale considerazione.

Background. Reticulocytes' counts and values of their related parameters are now easily and precisely supplied by automatic systems. The introduction of these parameters in physiology and pathology could be important, but further studied should be performed to define their use. The immature reticulocyte fraction (IRF) is a parameter which describes the maturation of reticulocytes and could be useful in pathology and also in peculiar physiological situations, as in sport activities.
Methods. The study has been performed by using an Abbott system on a wide number of élite athletes of different sports.
Results. The IRF mean of athletes was in reference range, calculated on the general population, but their values were quite high, indipendently from kind of sport and from period of the sport season.
Conclusions. The IRF values testify the continuous and physiological stimulation of the bone marrow in the élite athletes. The evaluation of athletes, even for legal purposes, must include this item.

Introduzione

Le moderne strumentazioni per ematologia permettono attualmente di effettuare automaticamente la conta dei reticolociti, mediante tecniche fluorimetriche e di descrivere alcune loro caratteristiche, concernenti specialmente il volume e le peculiarità della loro struttura interna. In particolare, si possono ricavare informazioni valide ed utili riguardanti lo stato di maturazione dei reticolociti (Ret), distinguendo particelle con maggiori quantità di residui ribosomiali e con volume più grande di quello dei reticolociti definitivi. La relativa novità della conta automatica reticolocitaria e l'incompletezza delle conoscenze sulle possibili connessioni e ricadute cliniche e pratiche dei parametri che descrivono le caratteristiche strutturali e volumetriche degli stessi, indicano la necessità di sviluppare studi in tal senso, soprat-

Corrispondenza a: Prof. Giuseppe Banfi, Direzione Sanitaria, Istituto Ortopedico Galeazzi, Via R. Galeazzi, 4 - 20161 Milano; e-mail: giuseppebanfi@supereva.it

tutto in alcuni stati fisiopatologici in cui la valutazione dei reticolociti è già entrata nella comune pratica medica o vi è un interesse specifico, anche medicolegale. È il caso dell'ematologia applicata allo sport, dove la conta reticolocitaria e taluni parametri, come il CHr (contenuto emoglobinico del reticolocita, ottenibile con tecnologia Bayer) sono entrati nella valutazione dello stato di salute dell'atleta professionista. Ad esempio, l'Unione Ciclistica Internazionale utilizza la conta reticolocitaria come parametro di secondo livello per la valutazione all'idoneità a gareggiare degli atleti: il mancato rispetto dei limiti di 0.2-2.4% di reticolociti impone il fermo per due settimane dello sportivo con successiva rivalutazione. Inoltre, nella valutazione indiretta per il sospetto di una stimolazione illecita del midollo osseo determinata attraverso degli algoritmi, già sperimentati da diverse Federazioni internazionali e nazionali, e riviste ultimamente per ovviare a possibili falsi positivi causati da soggiorni prolungati in altura, il ruolo dei reticolociti è cruciale[1,2].

L'accuratezza della conta reticolocitaria, in assenza di standardizzazione internazionale, è quindi fondamentale nell'ambito della medicina dello sport, dato che non vi è attualmente una perfetta collimazione tra i risultati ottenuti con differenti tecnologie[3], così come è importante ottenere valori di riferimento specifici per gli sportivi, abitualmente caratterizzati da una maggior attività del midollo osseo e da un maggior turnover degli eritrociti[4].

Nell'ambito dei parametri reticolocitari, la frazione immatura (Immature Reticulocyte Fraction, IRF) è fornita dalla tecnologia Abbott, con l'intento di descrivere nella maniera ottimale la distinzione tra i diversi stadi maturativi delle particelle.

Un incremento della percentuale di reticolociti, in presenza di un numero normale o aumentato di reticolociti in numero assoluto, specialmente se in contemporanea vi è un aumento di IRF, testimonia di una riduzione della vita media degli eritrociti. Una riduzione del numero assoluto dei reticolociti, in presenza di un aumento di IRF, indica una riduzione dell'attività eritropoietica, mentre un aumento del numero dei reticolociti e dell'IRF significa un recupero dell'organismo e la risoluzione della condizione preanemica o anemica franca. Il controllo della maturazione e dell'immissione in circolo dei reticolociti è effettuato dall'eritropoietina.

In un precedente studio, abbiamo evidenziato che i valori di IRF in atleti di élite sono elevati rispetto a quelli indicati come tipici della popolazione generale e indicati come valori di riferimento[5].

Presentiamo in questo studio una più ampia valutazione del parametro su atleti di élite di diverse specialità sportive di carattere misto con attivazione del metabolismo aerobico ed anaerobico, per quanto si possano considerare sport prevalentemente aerobici, per evidenziare il comportamento dell'IRF in soggetti sottoposti a elevata attività fisica, all'inizio della stagione agonistica e, per una parte di essi, in comparazione con una fase della stagione caratterizzata da allenamento e/o competizioni.

Materiali e metodi

L'esame emocromocitometrico è stato eseguito su Cell Dyn 4000 (Abbott, Chicago, USA), regolarmente sottoposto a controllo di qualità interno ed esterno. Il prelievo è stato eseguito con provette sottovuoto da 3 mL contenenti K_3EDTA (Kima, Arzergrande, Italia) il mattino, tra le ore 7 e le ore 9, con soggetti a digiuno ed osservando tutte le condizioni preanalitiche ottimali per la conservazione e il trasporto dei campioni, analizzati entro 6 ore dal prelievo[6]. L'analisi dei reticolociti prevede l'impiego di un colorante fluorescente (CD4K530), come avviene in diverse altre tecnologie, in luogo di tecniche colorimetriche. Il colorante raggiunge l'equilibrio di colorazione in 20 secondi e vi è una relazione lineare tra la fluorescenza e la concentrazione di RNA. Una soglia dinamica di separazione degli eritrociti maturi li divide dai reticolociti; un seconda soglia identifica la frazione dei reticolociti immaturi, che viene considerata come proporzione dell'intera popolazione reticolocitaria.

I prelievi sono stati effettuati su 103 atleti maschi di età compresa tra 18 e 36 anni, di cui 22 calciatori di una squadra di serie B, 41 nazionali di rugby, 24 ciclisti di una squadra professionistica e 16 nazionali di sci alpino. I prelievi sono stati effettuati all'inizio della stagione agonistica: dicembre 2003 per i ciclisti, maggio 2004 per gli sciatori, luglio 2004 per i calciatori, agosto 2004 per i rugbisti. Il confronto con la fase di allenamento e competizione è stato effettuato con i prelievi eseguiti a luglio 2004 per 15 sciatori e a febbraio 2004 per 18 calciatori. L'analisi dei reticolociti era già prevista dai protocolli di valutazione degli atleti esaminati.

I parametri del metabolismo del ferro (sideremia, ferritina, recettore solubile della transferrina, transferrina e saturazione della transferrina) sono stati eseguiti mediante analisi su siero eseguita su strumento Architect (Abbott, Chicago, USA).

Risultati

I valori dei reticolociti e dell'IRF riscontrati sugli atleti, nella loro totalità e nei singoli gruppi praticanti differenti specialità sportive sono elencati nella Tabella I. I valori dei reticolociti e dell'IRF dei 103 atleti sono elencati nella Tabella II.

I valori dei reticolociti e dell'IRF registrati all'inizio della stagione agonistica negli sportivi quiescenti e in una fase di allenamento e/o competizione sono

Tabella I - Valori della media (± deviazione standard) dei reticolociti e dell'IRF negli atleti esaminati. Non si rilevano differenze significative tra i valori degli atleti praticanti diverse discipline (Student *t* Test per dati non appaiati).

	Reticolociti (%)	IRF (%)
Totale degli atleti (n=103)	1.07 ± 0.29	0.29 ± 0.07
Calciatori (n=22)	0.95 ± 0.27	0.33 ± 0.03
Rugbisti (n=41)	1.11 ± 0.27	0.27 ± 0.08
Ciclisti (n=24)	1.12 ± 0.27	0.31 ± 0.04
Sciatori (n=16)	1.04 ± 0.24	0.28 ± 0.05

Tabella II - Valori di reticolociti (Ret, %) e IRF (%) di calciatori, rugbisti, ciclisti e sciatori. In grassetto sono evidenziati i valori di Ret dei 5 soggetti con livelli di recettore solubile per la transferrina >1.75 mg/L.

Calciatori		Rugbisti		Ciclisti		Sciatori	
Ret	IRF	Ret	IRF	Ret	IRF	Ret	IRF
0,75	0,28	1,18	0,25	1,05	0,28	0,95	0,23
0,65	0,37	1,1	0,22	1,04	0,32	1,2	0,3
0,8	0,33	1,03	0,32	0,78	0,21	0,88	0,19
0,67	0,27	1,16	0,29	0,55	0,18	1,25	0,34
0,66	0,35	1	0,29	1,26	0,27	1,11	0,33
0,86	0,39	0,97	0,29	1,21	0,27	***1,16***	0,21
1,76	0,39	0,59	0,19	1,03	0,26	0,82	0,23
0,62	0,31	1,27	0,26	0,97	0,22	0,86	0,29
1,03	0,38	1,71	0,26	1,59	0,25	0,74	0,28
1,26	0,38	1,11	0,21	0,99	0,29	1,34	0,32
0,94	0,31	1,21	0,25	1,68	0,3	1,03	0,34
0,9	0,32	1,04	0,17	0,83	0,28	0,9	0,25
0,87	0,29	1,12	0,21	0,79	0,2	0,93	0,34
0,76	0,33	0,96	0,28	1,17	0,25	0,93	0,31
1,07	0,35	1,15	0,26	1,03	0,28	1,47	0,33
1	0,36	1,01	0,29	0,97	0,27	1,05	0,28
0,72	0,33	***1,57***	0,28	0,88	0,26		
1,18	0,37	1,01	0,33	1	0,31		
1,15	0,32	1,08	0,24	1,08	0,3		
1,37	0,31	1,07	0,29	1,41	0,36		
0,96	0,3	1,17	0,26	1,18	0,31		
0,99	0,32	1,01	0,29	2,02	0,34		
		1,05	0,3	1,31	0,26		
		1,5	0,36	1,22	0,26		
		1,31	0,2				
		1,31	0,2				
		0,97	0,18				
		1,04	0,27				
		0,87	0,21				
		1,38	0,29				
		0,73	0,21				
		1,15	0,31				
		0,98	0,25				
		0,91	0,23				
		1,04	0,38				
		0,99	0,65				
		0,83	0,37				
		1,32	0,22				
		0,83	0,25				
		2,15	0,33				
		0,97	0,18				

elencati in Tabella III. I valori dei reticolociti di tutti gli atleti permanevano all'interno del range di riferimento di 0.5-2.5%[7]

I valori di emoglobina, ematocrito e la conta degli eritrociti risultavano all'interno dei valori di riferimento (14-17.4 g/dL, 41.5-50.4%, e 4.5-5.9 $x10^{12}$/L, rispettivamente). Il volume globulare medio (MCV) era ridotto in un caso (73 fL) e in altri sei casi risultava compreso tra 90 e 93 fL; i valori di riferimento per l'MCV secondo Perkins[7] risultano di 80-96 fL.

I valori del metabolismo del ferro erano altrettanto inseriti nel range di riferimento[8], con l'eccezione di 5 atleti con recettore solubile della transferrina >1.75 mg/L, 9 con saturazione della transferrina <20% e 1 con >60%.

Tabella III - Valori della media (± deviazione standard) dei reticolociti e dell'IRF in due gruppi di atleti osservati a riposo, prima dell'inizio della stagione agonistica e durante una fase di allenamento e/o competizione. Non si registrano differenze significative tra i valori riscontrati nelle due diverse occasioni (Student t Test per dati appaiati).

	Inizio della stagione agonistica		Durante la stagione agonistica	
	Reticolociti (%)	IRF (%)	Reticolociti (%)	RF (%)
Calciatori (n=18)	0.92 ± 0.27	0.33 ± 0.03	0.98 ± 0.26	0.30 ± 0.04
Sciatori (n=15)	1.00 ± 0.24	0.27 ± 0.05	0.98 ± 0.24	0.32 ± 0.04

Discussione

I valori dei reticolociti e dell'IRF registrati su un vasto numero di atleti di élite appartenenti a discipline diverse, tre di squadra e una individuale, miste, prevalentemente aerobiche, indicano una sostanziale uniformità tra i vari gruppi all'interno dei valori di riferimento considerati per la popolazione generale. Una prima indicazione dello studio risulta pertanto esser che i valori reticolocitari non sono sport-dipendenti e che gli atleti non costituiscono una coorte separata dalla popolazione generale, per quanto vi siano delle peculiarità. Infatti, i valori di IRF rilevati sugli atleti risultano esser spesso più elevati di quelli riscontrati nella popolazione generale e, in ogni caso, la loro media si situa presso il valore superiore dei limiti di riferimento: nel caso di due gruppi di sportivi tale media lo supera. Il range di riferimento per l'IRF è 0.10-0.30%[9], intervallo proposto anche dalla casa produttrice della strumentazione ematologica automatica. Tale intervallo è stato confermato su 100 soggetti sani con una media di 0.20 e una deviazione standard di 0.11 e una moda di 0.22[10]. Gli atleti sembrano quindi presentare una più vivace attività del midollo osseo, evidenziabile attraverso un'accelerazione del processo di produzione degli eritrociti, attraverso la presenza di un numero co-

stantemente elevato, per quanto non patologico di reticolociti non completamente maturi. In effetti, è noto che negli atleti esiste una costante attivazione del midollo osseo per la produzione di emoglobina e eritrociti, poichè vi è una loro perdita a causa di fenomeni di emolisi costanti, seppure non rilevanti e che non sconfinano nella patologia. L'emolisi rappresenta la causa principale di perdita di emoglobina[11,12] per quanto altre quote della proteina, di minor entità, possono esser perdute per gemizio gastrointestinale[13] e non rimpiazzate adeguatamente per una dieta non bilanciata o incongrua[14]. I valori di IRF indicano che effettivamente si mantiene un elevato turnover degli eritrociti negli sportivi, in assenza di patologie conclamate riconosciute per esser causa di elevazione del parametro[15,16].

Pertanto, le variazioni del parametro sono chiaramente collegate alla situazione fisiologica di incremento dell'attività motoria, cui si associa un incremento del fabbisogno di nuovi eritrociti. Il rilievo di una sostanziale costanza del parametro durante la fase precedente la stagione agonistica e in fase di allenamento intenso in preparazione delle competizioni, come negli sciatori, o verso la fine della stagione agonistica, nel periodo delle competizioni con l'adeguato e conseguente livello di impegno psicofisico, come nei calciatori, indica che la stimolazione del midollo osseo alla produzione e al ricambio di eritrociti è continua e permane anche per periodi di minor intensità di attività. Occorre rilevare che i periodi di riposo assoluto per gli atleti professionisti non superano generalmente il periodo di un mese e un certo grado di attività di mantenimento viene comunque effettuata, per cui il periodo di quiescenza non va, di solito, a superare il tempo di ricambio degli eritrociti.

In conclusione, il nostro studio conferma la validità dei valori di riferimento dell'IRF anche per gli atleti, con la rilevazione di una maggior attività del midollo osseo degli sportivi legata alla loro particolare situazione fisiologica di aumentato turnover dell'emoglobina e degli eritrociti. Tale situazione si mantiene in maniera costante a prescindere dall'intensità dell'attività motoria e sportiva, almeno per quanto concerne i valori della conta reticolocitaria e dell'IRF. La definizione di valori di riferimento specifici per i reticolociti e per i parametri correlati su popolazioni vaste e controllate è necessaria per utilizzare questi dati, oggi forniti dall'automazione, per giudicare lo stato di salute e lo stato di forma dell'atleta e soprattutto l'eventuale segnalazione di stimolazioni abnormi del midollo osseo. In effetti, la presenza di valori tendenzialmente elevati di IRF negli sportivi e quindi di reticolociti con elevato contenuto di RNA residuo, deve esser tenuta in considerazione laddove si prefiguri l'utilizzo della biologia molecolare, non disponibile presso tutti i laboratori clinici, per evidenziare la maturazione precoce o massiva degli stessi dal midollo osseo sotto stimolazione di eritropoietina[17].

Bibliografia

1. Gore CJ, Parisotto R, Ashenden MJ, Stray-Gundersen, J, Sharpe K, Hopkins W, et al. Second-generation blood tests to detect erythropoietin abuse of athletes. Haematologica 2003; 88:333-44.
2. Ashenden MJ, Gore CJ, Parisotto R, Sharpe K, Hopkins WG, Hahn AG. Effect of altitude on second-generation blood tests to detect Epo abuse by athletes. Haematologica 2003; 88:1053-62.
3. Banfi G, Dolci A, Zorzino L, Longhi E, Barberis M. Comparison of 3 automatic systems for reticulocytes counts during an ultraendurance mountain marathon. J Sports Med Phys Fitness 2003; 43:256-7.
4. Pizza FX, Flynn MG, Boone JB, Rodriguez-Zayas JR, Andres FF. Serum haptoglobin and ferritin during a competitive running and swimming season. Int J Sports Med 1997; 18:233-7.
5. Banfi G, Dolci A, Schönhuber H, Costantino B. Values of the parameter IRF in elite athletes. Clin lab Haemat 2004; 26:241-2.
6. Banfi G, Dolci A. Preanalyical phase of sport biochemistry and haematology. J Sports Med Phys Fitness 2003; 43:223-30.
7. Perkins SL. Normal blood and bone marrow values in humans. In: Wintrobe's clinical haematology. 10th edition. Baltimore: Williams and Wilkins Eds; 1998. p. 2738.
8. Burtis CA, Ashwood ER. Tietz textbook of clinical chemistry. 2nd edition. Philadelphia: WB Saunders Company Ed; 1994. pp. 2176-216.
9. Davis BH, Bigelow NC, van Hove L. IRF and reticulocytes counts, comparison of Abbott CD4000, Sysmex R-3000, thiazol flow cytometry, and manual counts. Lab Hematol 1996; 2:144-6.
10. Kim RY, Kantor J, Landaysn M, Kihara J, Bearden J, Sheehan E. A rapid and sensitive reticulocyte method on a high-throughput hematology instrument. Lab Hematol 1997; 3:19-26
11. Telford RD, Sly GJ, Hahn AG, Cunningham RB, Bryant C, Smith JA. Footstrike is the major cause of hemolysis during running. J Appl Physiol 2003; 94:38-42.
12. Selby GB, Eichner ER. Endurance swimming, intravascular hemolysis, anemia, and iron depletion: new perspective on athlete's anemia. Am J Med 1986; 81:791-4.
13. Stewart JG, Ahlquist DA, McGill DB, Ilstrup DM, Schwartz S, Owen RA. Gastrointestinal blood loss and anemia in runners. Ann Int Med 1984; 100:843-5.
14. Smith AD. The female athlete triad: causes, diagnosis, and treatment. Phys Sportsmed 1996; 24:67-75.
15. Kendall RG, Mellors I, Hardy J, Mardle B. Patients with pulmonary and cardiac disease show an elevated proportion of immature reticulocytes. Clin Lab Hematol 2001; 23:27-31.
16. Torres Gomez A, Casano J, Sanchez J, Madrigal E, Blanco F, Alvarez MA. Utility of reticulocyte maturation parameters in the differential diagnosis of macrocytic anemias. Clin Lab Hematol 2003; 25:283-8.
17. Varlet-Marie E, Audran M, Lejeune M, Bonafoux B, Sicart MT, Marti J, et al. Analysis of human reticulocyte genes reveals altered erythropoiesis: potential use to detect recombinant human eryhtropoietin doping. Haematologica 2004; 89:991-7.