

Pregledni prispevek/Review article

KLINIČNI POMEN NOVIH METOD (KOLIČINA HEMOGLOBINA V RETIKULOCITIH IN HIPOKROMNI ERITROCITI) ZA OCENO POMANJKANJA ŽELEZA V TELESU

CLINICAL UTILITY OF NEW DIAGNOSTIC APPROACHES (RETICULOCYTE HEMOGLOBIN CONTENT AND HYPOCHROMIC RED CELLS) FOR IRON DEFICIENCY STATES

Irena Preložnik-Zupan¹, Katarina Lenart²

¹ Klinični oddelek za hematologijo, Klinični center, Zaloška 7, 1525 Ljubljana

² Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo, Klinični center, Njegoševa 4, 1525 Ljubljana

Prispelo 2004-01-12, sprejeto 2004-03-24; ZDRAV VESTN 2004; 73: 499-502

Ključne besede: zaloge železa v telesu; absolutno in funkcionalno pomanjkanje železa; količina hemoglobina v retikulocitih; hipokromni eritrociti

Izvleček - Izhodišča. Anemija zaradi pomanjkanja železa ne predstavlja posebnega diagnostičnega problema za zdravnika. V bolj zapletenih stanjih pa klasični biokemični kazalci pomanjkanja železa, kot so koncentracija železa, nasičenost transferina in koncentracija feritina v serumu, niso dovolj zanesljivi za oceno stanjs prehodnim, funkcionalnim pomanjkanjem železa. Gre za neravnovesje med potrebami in oskrbo kostnega mozga z železom. V takšnih stanjih sta v pomoč dva hematološka kazalca: količina hemoglobina v retikulocitih (KHr) in delež hipokromnih eritrocitov (hypoE).

Zaključki. KHr in hypoE sta pomembna nova diagnostična kazalca za oceno pomanjkanja železa v telesu. KHr je zgodnji kazalec zlasti prehodnega, funkcionalnega pomanjkanja železa, ker je življenjska doba retikulocitov v krvi 1-2 dni. HypoE dajejo oceno večmesečnega obdobja, ker je življenjska doba eritrocitov okoli 120 dni in so pozni kazalec okrnjene eritropoeze zaradi pomanjkanja železa. Z njima lahko izboljšamo oceno pomanjkanja železa, še posebej v stanjih, kot so zdravljenje z eritropoetinom, anemija pri kroničnih boleznih, pomanjkanje železa v zgodnjem otroštvu in odkrivanje nedovoljene uporabe eritropoetina v športu. Obe metodi smo ob sodelovanju Kliničnega oddelka za hematologijo in Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo že uvedli v klinično uporabo.

Key words: tissue iron status; absolute and functional iron deficiency; reticulocyte hemoglobin content; hypochromic red cells

Abstract - Background. Classical iron deficiency does not represent a particular diagnostic challenge for the clinicians. However, in several more complicated clinical conditions, classical biochemical indices such as serum iron, transferrin saturation and ferritin may not be informative enough to reflect transient iron-deficient states and functional iron deficiency. It is defined as an imbalance between iron needs of the erythroid marrow and the iron supply. Two hematological parameters, the proportions of hypochromic red cells (hypoE) and reticulocyte hemoglobin content (CHr), have major value in this setting.

Conclusions. CHr and hypoE provide a useful new approach to the diagnosis of iron-deficient states. CHr is an early marker of functional iron deficiency, as reticulocytes exist in the circulation for only 1-2 days. Because erythrocytes have a lifespan about 120 days, the hypoE is able to provide information over a several month period and is a late indicator of iron-restricted erythropoiesis. With these new parameters identification of iron deficiency could be improved in some clinical conditions such as erythropoietin therapy, anemia of chronic disease, iron deficiency of early childhood and in the illicit use of erythropoietin for blood doping of competitive athletes. We have already introduced both new methods in clinical practice with cooperation between Department of hematology and Institut for Clinical Chemistry and Biochemistry.

Uvod

Čeprav je anemija zaradi pomanjkanja železa med bolniki zelo razširjena, pa klasično pomanjkanje železa, povezano s kronično izgubo krvi ali pomanjkljivim vnosom železa s hrano,

ni več poseben diagnostični problem (1, 2). Običajno za laboratorijsko diagnozo teh stanj določamo različne biokemične in hematološke kazalce. Med biokemičnimi kazalci v serumu določamo koncentracijo železa, koncentracijo transferina, nasičenost transferina, koncentracijo feritina in, kolikor je pre-

iskava dosegljiva, tudi koncentracijo topnih transferinskih receptorjev. Hematološki kazalci, ki jih uporabljamo za oceno anemije te vrste, so koncentracija hemoglobina v krvi (Hb), hematokrit (Ht) ter različni eritrocitni in retikulocitni indeksi, s katerimi ugotovimo hipokromne in mikrocitne eritrocite (3). Na žalost nimamo referenčne metode, s katero bi lahko zelo natančno opredelili biokemično pomanjkanje železa v telesu. Barvanje biopsijskega vzorca kostnega mozga na prisotnost železa je še vedno zlati standard za oceno zaloga železa, vendar pa invazivnost metode zmanjšuje njeno široko uporabo. Pri bolnikih, ki jih zdravimo nadomestno s pripravki železa, spremljamo hematološki odgovor s porastom števila retikulocitov v krvi (1).

Velik izziv še vedno ostaja pravilna ocena zaloga železa ter odkrivanje in zdravljenje pomanjkanja železa v telesu pri stanjih, kot so zdravljenje z rekombinantnim humanim eritropoetinom (r-HuEPO), anemija pri kroničnih boleznih in pomanjkanje železa v zgodnjem otroštvu. Namen sestavka je predstaviti noveše hematološke diagnostične kazalce, ki lahko koristno prispevajo k diagnostiki in zdravljenju pomanjkanja železa predvsem pri teh bolj zapletenih stanjih.

Ocena zaloga železa v telesu

Dve tretjini železa se v telesu nahaja v hemoglobinu (2,5–3 g), ostalo pa v retikuloendotelih, jetrnih celicah in v celicah skeletnih mišic (0,5–1,0 g) v obliki feritina ali hemosiderina. Feritin je vodotopna spojina železa in beljakovine, ki je v manjših količinah prisoten tudi v plazmi. Hemosiderin je netopna spojina železa in beljakovine, ki se nahaja v makrofagih kostnega mozga, jeter in vranice. Vsak dan izgubljam 0,5–1,0 mg železa z blatom, urinom in znojenjem, ženske pa dodatno z menstruacijo 0,5–0,7 mg dnevno. Povečane potrebe po železu nastanejo v obdobju rasti (približno 0,6 mg/dan) in v nosečnosti (1–2 mg/dan).

V klinični praksi ocenjujemo zaloge železa v organizmu z določanjem koncentracije železa v serumu, nasičenostjo transferina in koncentracije feritina v serumu (4). Serumsko železo biološko niha pri posamezni osebi tudi do 30%. Pozno popoldne so vrednosti višje in se spreminjajo tudi po obroku hrane. Vrednosti so odvisne tudi od metode določanja. Nasičenost transferina zrcali železo v krvnem obtoku. Transferin je podobno kot albumin negativni akutni vnetni reaktant, kar pomeni, da se pri vnetju njegova koncentracija v krvi zmanjša. Dobimo lažno nizke vrednosti. Tudi normalne vrednosti feritina ne izključijo pomanjkanja železa. Pri nekaterih boleznih najdemo »lažno« povečano koncentracijo serumskega feritina, ki pa ne zrcali zaloga železa, kar vidimo pri vnetjih, okužbah, nekaterih novotvorbah, jetrnih boleznih, čezmerni telesni dejavnosti. Feritin je podobno kot C-reaktivni protein pozitivni vnetni reaktant. Ob okužbi ali vnetju najdemo neustrezno nizko koncentracijo serumskega železa in transferina ter neustrezno visoko koncentracijo serumskega feritina (4, 5).

Absolutno in funkcionalno pomanjkanje železa v organizmu

O absolutnem pomanjkanju železa govorimo takrat, kadar so zaloge v telesu zmanjšane ali popolnoma izčrpane, kar ocenimo s koncentracijo serumskega feritina in nasičenostjo transferina (6, 7). Pri posebnih bolezenskih stanjih, kot je kronična ledvična odpoved na nadomestnem zdravljenju s hemodializo, so želene vrednosti zaloga železa drugačne (5, 8, 9).

Kadar je potreba po oskrbi z železom povečana zaradi povečane sinteze hemoglobina in retikuloendotelni sistem ni sposoben sprostiti tolikšne količine železa kljub zadostnim ali celo povečanim zalogam, govorimo o funkcionalnem pomanjka-

nju železa (10–12). To stanje je lahko posledica zdravljenja z r-HuEPO, ki močno pospeši eritropoezo, lahko pa je posledica omejenega sproščanja železa iz zaloga zaradi vnetja, npr. pri anemiji ob kroničnih boleznih (6). Uporaba r-HuEPO je vse večja. Začetne izkušnje pri kroničnih dializnih bolnikih (10) in kasnejše študije pri zdravih prostovoljcih (11, 12) so pokazale, da se eritropoeza po zdravljenju z r-HuEPO tako pospeši, da se kljub nadomeščanju železa v obliki tablet pojavi okrnjena eritropoeza zaradi pomanjkanja železa. To prehodno neujemanje med zalogami in potrebami po železu (funkcionalno pomanjkanje železa) lahko preprečimo z manjšim odmerkom r-HuEPO ali parenteralnim nadomeščanjem železa (6).

Določitev koncentracije feritina v serumu zadostuje pri zdravih osebah za oceno odgovora kostnega mozga na r-HuEPO, ne pa v stanjih, kot so npr. hipertiroidizem, vnetja/okužbe, jetrne bolezni, novotvorbe, alkoholizem, uporaba oralne kontracepcije. Potrebni so dodatni laboratorijski kazalci za oceno ravnotežja med eritropoezo in razpoložljivim železom.

Količina hemoglobina v retikulocitih (K_{Hr}) in hipokromni eritrociti (hipoE)

Izhodišča

Določanje števila retikulocitov v krvi je že od nekdaj pomemben kazalec eritropoeze. Ker se nahajajo retikulociti v krvnem obtoku le od 18 do 36 ur po sprostitvi iz kostnega mozga, so kazalec trenutnega stanja eritropoeze (4).

Avtomatsko določanje števila retikulocitov z novimi hematološkimi analizatorji nam poleg ponovljivih in zanesljivih določitev absolutnega in relativnega števila retikulocitov omogoča tudi določitev retikulocitnih parametrov. Med temi so pomembni: povprečni volumen retikulocitov (PVr) v fl, povprečna koncentracija hemoglobina v retikulocitih (PK_{Hr}) v g/l, količina hemoglobina v retikulocitu (K_{Hr}) v pg in indeks dozorelosti retikulocitov v odvisnosti od količine RNK v retikulocitih. Med omenjenimi kazalci se je K_{Hr} izkazal za občutljiv in zgodnji kazalec funkcionalnega pomanjkanja železa tako pri zdravih preiskovancih, ki so prejeli r-HuEPO (13), pri dializnih bolnikih (14) in pri otrocih (15).

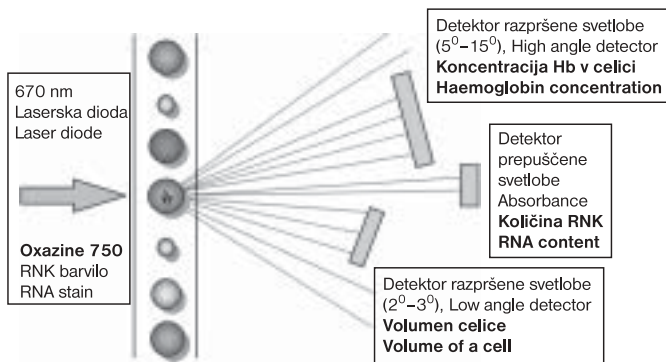
Drugi kazalec, ki kaže na okrnjeno eritropoezo v kostnem mozgu, je odstotek hipokromnih eritrocitov (hipoE). To so celice s koncentracijo hemoglobina < 280 g/L. Pojavijo se pri absolutnem pomanjkanju železa v telesu ali pri bolnikih, zdravljenih z r-HuEPO in funkcionalnim pomanjkanjem železa (10, 11). Zaradi dolge življenjske dobe eritrocitov (živijo približno 120 dni pri zdravih ljudeh) opazimo okrnjeno eritropoezo zaradi pomanjkanja železa in posledično spremembo v odstotku hipokromnih eritrocitov šele po daljšem obdobju.

Opis metode

Analizator

Absolutno in relativno število retikulocitov, retikulocitne parametre (PVr, PK_{Hr} in K_{Hr}) in odstotek hipoE smo določali na hematološkem analizatorju ADVIA 120 proizvajalca Bayer Diagnostics (Tarrytown, NY, ZDA).

Citokemična reakcija poteka v dveh stopnjah. V prvi stopnji se celice (eritrociti, retikulociti) zaradi prisotnosti površinsko aktivnih snovi spremenijo iz diskoidne v okroglo obliko, pri čemer ostane volumen celic nespremenjen. V drugi stopnji se celice, ki vsebujejo RNK, obarvajo z barvilom oksazin 750. Stalen volumen suspenzije celic potuje iz reakcijske komore v pretočno celico, kjer se izmeri intenzivnost razpršene laserske svetlobe pri nizkem kotu (2–3°), ter tako določimo volumen celice (PVr) in intenziteta razpršene laserske svetlobe pri visokem kotu (5–15°), s katero izmerimo koncentracijo hemoglobina v celici (PK_{Hr}). Analizator izmeri tudi absorpcijo



Sl. 1. Pretočna celica, skozi katero prehajajo eritrociti in retikulociti, ki jih ločimo na osnovi absorpcije laserske svetlobe. Intenzivnost razpršene laserske svetlobe se meri pri nizkem kotu (2–3°), ki je povezana z določitvijo prostornine celice (PVr), in pri visokem kotu (5–15°), ki je povezana z določitvijo koncentracije hemoglobina v celici (PKHr).

Figure 1. Red blood cells and reticulocytes are passing through the flow cell and we can distinguish them by the absorbance of different scatter laser light. The low angle 2–3 degrees scatter represents the volume of the cell, the high angle 5–15 degrees scatter represents the hemoglobin concentration of the cells.

cijo laserske svetlobe, ki je osnova za razdelitev retikulocitov v tri populacije (po starosti celice) glede na količino RNK v celici (Sl. 1). Iz izmerjenih parametrov PVr in PKHr analizador izračuna še KHr po formuli $KHr = PVr \times PKHr$.

Odstotek hipoE prav tako lahko določimo s pretočno citometrijo. Analizador hkrati izmeri intenzivnost razpršene laserske svetlobe pod nizkim kotom ter določi volumen eritrocita (PVE) in intenzivnost razpršene laserske svetlobe pod visokim kotom, s katero se s pomočjo refrakturnega indeksa določi koncentracija hemoglobina v eritrocitu (PKHE).

Orientacijske normalne (referenčne) vrednosti

Uporabili smo vzorce 101 zdravih preiskovancev (50 moških, 51 žensk) z normalno krvno sliko. Starost preiskovancev je bila 21–69 let (mediana 34 let). Za analizo retikulocitnih parametrov in odstotka hipoE smo uporabili venško kri, pomešano z antikoagulantom K₂EDTA. Vse analize smo opravili najkasneje v osmih urah po odvzemu krvi.

Podatke smo analizirali s statističnim programom MED CALC (Medcalc Software, Mariakerke, Belgium, 1999). Normalnost porazdelitve smo preverili s Kolmogorov-Smirnovim testom. Za izračun orientacijskih normalnih vrednosti smo upoštevali 95% rezultatov od 2,5 do 97,5 percentila. Rezultati so zbrani v razpredelnici 1.

Omejitve metode

Do možnih napak pri določanju retikulocitov s to metodo lahko pride predvsem v primeru sprememb v vzorcu krvi, kot so vključki v eritrocitih, ki vsebujejo RNK ali DNK (Howell Jollyeva, Heinzova in Pappenheimova telesca) (16). Lažno normalne vrednosti KHr določimo v primeru makrocitotze eritrocitov.

Trenutno lahko določimo KHr in hipoE samo z eno vrsto hematoloških analizatorjev (ADVIA 120), kar je velika omejitev pri klinični uporabi teh kazalcev. V Sloveniji imajo to vrsto hematoloških analizatorjev v Kliničnem centru v Ljubljani, Splošni bolnišnici Slovenj Gradec, Splošni bolnišnici Murska Sobota in v Zdravstvenih domovih Kranj, Krško ter Novo mesto.

Razpr. 1. *Orientacijske normalne vrednosti za retikulocitne parametre in odstotek hipoE, izmerjenih z analizatorjem ADVIA 120.*

Table 1. *Normal ranges for the reticulocyte indices and percentage of hypochromic red cells measured by the ADVIA 120.*

| Parameter Indicator | Orientacijske normalne vrednosti Normal ranges |
|---|--|
| Retikulociti (10 ⁹ /L) Reticulocytes (10 ⁹ /L) | 34,0–120,6 |
| Retikulociti (%) Reticulocytes (%) | 0,7–2,8 |
| PVr (fl) MCVr (fl) | 92,2–108,4 |
| KHr (pg) CHR (pg) | 30,0–36,0 |
| % hipoE % hypoE | < 5 |

PVr – povprečen volumen retikulocitov, KHr – količina hemoglobina v retikulocitih, % hipoE – odstotek hipokromnih eritrocitov
MCVr – mean corpuscular volume of reticulocytes, CHR – reticulocyte hemoglobin content, % hypoE – percentage of hypochromic red cells

Klinični pomen novih hematoloških kazalcev pomanjkanja železa

Največ podatkov o uporabnosti opisanih hematoloških kazalcev pomanjkanja železa najdemo pri: 1. zdravljenju z r-HuEPO, 2. odkrivanju pomanjkanja železa pri anemiji ob kroničnih boleznih, 3. v zgodnjem otroštvu, kjer je pomanjkanje železa z anemijo ali brez povezano z motnjo kognitivnega razvoja otroka, in 4. pri odkrivanju nedovoljenega uživanja sredstev, ki povečujejo telesno zmogljivost v športu (doping) (11–15, 17–23).

Zdravljenje z r-HuEPO

Indikacije za zdravljenje z eritropoetinom se širijo. Na trg prihajajo nove oblike zdravila z daljšim razpolovnim časom (24). Največ izkušenj z zdravilom imamo pri dializnih bolnikih (10) in zdravih prostovoljcih (11, 12). Funkcionalno pomanjkanje železa se pojavi tudi pri zdravih prostovoljcih, ki prejema eritropoetin, z normalnimi zalogi železa v telesu. To je posledica pospešene eritropoeze, ki je hkrati prehodno okrnjena zaradi nezadostnega sproščanja železa ob povečanih potrebah iz normalnih zalog. Razvije se mikrocitoza retikulocitov in eritrocitov, ki je ne moremo razlikovati od mikrocitotze, ki nastane pri absolutnem pomanjkanju železa (11, 12). Pri dializnih bolnikih lahko najdemo visoko koncentracijo feritina v serumu (npr. 500 µg/L in več), zaloge železa pa so neustrezne in se anemija popravi šele po dodatku železa. Pri tej skupini bolnikov so ugotovili, da je KHr ustrezen kazalec funkcionalnega pomanjkanja železa (14, 17). Z njim natančneje določimo ustrezen odmerek r-HuEPO in železa, s tem pa zmanjšamo stroške zaradi neustreznega povečevanja odmerkov r-HuEPO pri neodzivnih bolnikih in stranske učinke zaradi prevelikega vnosa parenteralnih pripravkov železa, kar dokazuje študija Fishbana s sodelavci (18).

Anemija ob kroničnih boleznih

Potrditve absolutnega ali funkcionalnega pomanjkanja železa je posebej zahtevna pri bolnikih z akutnimi ali kroničnimi vnetnimi obolenji, kroničnimi okužbami in novotvorbami (4, 5, 25). S klasičnimi biokemičnimi kazalci običajno ugotovimo povečane zaloge železa (povečana koncentracija feritina v serumu, majhna koncentracija železa in zmanjšana vezalna kapaciteta za železo), iz katerih pa se železo zaradi vnetnih do-

gajanj ne more sproščati. Pri pregledu kostnega mozga, barvanega na prisotnost železa, ugotovimo veliko količino železa v makrofagih, ne pa v sideroblastih (eritroblasti z zrnci železa, ki jih najdemo v zdravem kostnem mozgu vsaj eno tretjino). Zaradi funkcionalnega pomanjkanja železa se razvija okrnjena eritropoeza. Anemija je običajno zmerno hude stopnje, normocitna, redko mikrocitna, s koncentracijo hemoglobina med 70–110 g/L. V njen nastanek je vpletenih več dejavnikov. Bolniki prejemajo različna zdravila, ki lahko zavirajo delovanje kostnega mozga, ali pa najdemo v njem zasevke. Priporoča se zdravljenje anemije z velikimi odmerki eritropoetina (npr. 10.000 E, 3-krat na teden).

Anemija zaradi pomanjkanja železa v zgodnjem otroštvu

Anemija zaradi pomanjkanja železa v zgodnjem otroštvu je še vedno med vodilnimi vzroki slabokrvnosti tega obdobja. Po podatkih iz ZDA ima med 700.000 otroki, starimi 1–2 leti, 240.000 anemijo zaradi pomanjkanja železa (21). Železo je pomembno za normalni razvoj centralnega živčnega sistema pri otroku (22). Medtem ko se anemija zadovoljivo popravi po zdravljenju s pripravki železa, pa so ugotovili, da lahko ostanejo okrnjene nekatere kognitivne funkcije (23). Iz tega razloga je izjemnega pomena čimprej prepoznati pomanjkanje železa še pred razvojem anemije. V študiji Brugnara in sodelavcev so ocenili KHR kot bolj zanesljiv parameter za zgodnje odkrivanje pomanjkanja železa pri otrocih (15), ker so klasični biokemični kazalci nezanesljivi.

Uživanje sredstev, ki povečujejo telesno zmogljivost v športu

Nove informacije o razumevanju metabolizma železa in patofiziologije eritrocitov je ponudila prepovedana uporaba r-HuEPO in sorodnih zdravil v atletiki. Namen zlorabe r-HuEPO in sorodnih zdravil je povečati koncentracijo hemoglobina in hematokrit ter s tem telesno sposobnost tekmovalcev, kar je dobilo velike razsežnosti zlasti na Olimpijskih igrah v letih 2000 in 2002. Kombinacija biokemičnih in hematoloških diagnostičnih kazalcev je v pomoč pri odkrivanju zlorabe katerekoli snovi, ki deluje kot eritropoetin (19, 20). V času 72 ur po dajanju ugotovimo visok hematokrit oz. koncentracijo hemoglobina, povečan hematokrit retikulocitov (zmnožek števila retikulocitov in povprečnega volumna retikulocitov), povečano koncentracijo serumskega eritropoetina in transferina v serumu, povečan odstotek hipoE (pri daljši uporabi r-HuEPO) in zmanjšano KHR.

Zaključki

Novi diagnostični kazalci pomanjkanja železa v telesu, KHR in hipoE lahko koristno pripomorejo pri odkrivanju absolutnega in funkcionalnega pomanjkanja železa še posebej v stanjih, ko klasični biokemični kazalci ne dajejo zadovoljivih rezultatov. To so bolezni, kjer zdravimo z r-HuEPO, anemija pri kroničnih boleznih, pomanjkanje železa v zgodnjem otroštvu in pri uživanju nedovoljenih sredstev za povečanje telesne sposobnosti v športu. Dajejo nam vpogled v trenutno stanje eritropoeze. Posebna prednost novih hematoloških kazalcev je tudi v tem, da ne potrebujemo dodatnega odvzema

krvi, temveč jih določamo hkrati iz krvi, ki je bila odvzeta za krvno sliko. Žal je razširjenost analizatorjev, s katerimi je mogoče opraviti te preiskave, majhna.

Literatura

1. Andoljšek D. Bolezni krvi in krvotvornih organov. In: Kocjančič A, Mrevlje F. Interna medicina, druga, dopolnjena izdaja. Ljubljana: EWO, 1998: 1037–131.
2. Looker AC, Dallman PR, Carroll MD, Gunter EW, Johnson CL. Prevalence of iron deficiency in the United States. *JAMA* 1997; 277: 973–6.
3. Brugnara C. A hematologic »gold standard« for iron-deficient states? *Clin Chem* 2002; 48: 981–2.
4. Brugnara C. Iron deficiency and erythropoiesis: new diagnostic approaches. *Clin Chem* 2003; 49: 1573–8.
5. Van Wyck DB, Bailie G, Aronof G. Just the FAQs: frequently asked questions about iron and anemia in patients with chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 2002; 39: 426–32.
6. Kaltwasser JP, Gottschalk R. Erythropoietin and iron. *Kidney Int* 1999; 55: 49–56.
7. Worwood M. Laboratory determination of iron status. In: Brock JH, Halliday JW, Pippard MJ, Powell LW. Iron metabolism in health and disease. London, WB Saunders, 1994: 449–76.
8. Fernandez-Rodriguez AM, Guindeo-Casasus MC, Molero-Labarta T et al. Diagnosis of iron deficiency in chronic renal failure. *Am J Kidney Dis* 1999; 34: 508–13.
9. Nissenson AR. Achieving target hematocrit in dialysis patients: New concepts in iron management. *Am J Kidney Dis* 1997; 30: 907–11.
10. Macdougall IC, Cavill I, Hulme B et al. Detection of functional iron deficiency during erythropoietin treatment: a new approach. *BMJ* 1992; 304: 225–6.
11. Brugnara C, Chambers LA, Malynn E, Goldberg MA, Kruskall MS. Red cell regeneration induced by subcutaneous recombinant erythropoietin: iron-deficient erythropoiesis in iron-replete subjects. *Blood* 1993; 81: 956–64.
12. Brugnara C, Colella GM, Cremins JC et al. Effect of subcutaneous recombinant human erythropoietin in normal subjects: development of decreased reticulocyte hemoglobin content in iron-deficient erythropoiesis. *J Lab Clin Med* 1994; 123: 660–7.
13. Brugnara C, Laufer MR, Friedman AJ, Bridges K, Platt O. Reticulocyte hemoglobin content (CHr): early indicator of iron deficiency and response to therapy. *Blood* 1994; 83 (10): 3100–1.
14. Fishbane S, Galgano C, Langley RC, Jr, Canfield W, Maesaka JK. Reticulocyte hemoglobin content in the evaluation of iron status of hemodialysis patients. *Kidney Int* 1997; 52 (1): 217–22.
15. Brugnara C, Zurakowski D, DiCanzio J, Boyd T, Platt O. Reticulocyte hemoglobin content to diagnose iron deficiency in children. *JAMA* 1999; 281 (23): 2225–30.
16. NCCLS. Methods for reticulocyte Counting (Flow Cytometry and Supravital Dyes; Approved Guideline. NCCLS document 1997; H44-A, 17 (15).
17. Tessitore N, Solero GP, Lippi G et al. The role of iron status markers in predicting response to intravenous iron in haemodialysis patients on maintenance erythropoietin. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 1416–23.
18. Fishbane S, Shapiro W, Dutka P, Valenzuela OF, Faubert J. A randomized trial of iron deficiency testing strategies in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2001; 60: 2406–11.
19. Parisotto R, Gore CJ, Emslie KR et al. A novel method utilizing markers of altered erythropoiesis for the detection of recombinant human erythropoietin abuse in athletes. *Haematologica* 2000; 85: 564–72.
20. Ashenden MJ. A strategy to deter blood doping in sport. *Haematologica* 2002; 87: 225–34.
21. Looker AC, Dallman PR, Carroll MD, Gunter EW, Johnson CL. Prevalence of iron deficiency in the United States. *JAMA* 1997; 277: 973–6.
22. Lozoff B, Jimenez E, Wolf A. Long-term developmental outcome of infants with iron deficiency. *N Engl J Med* 1991; 325: 687–94.
23. Lozoff B, Jimenez E, Hagen J, Mollen E, Wolf AW. Poorer behavioral and developmental outcome more than 10 years after treatment for iron deficiency in infancy. *Pediatrics* 2000; 105: E51.
24. Vansteenkiste J, Pirker R, Massuti B et al. Double-blind, placebo-controlled, randomized phase III trial of darbepoetin alfa in lung cancer patients receiving chemotherapy (Comment). *J Nat Cancer Inst* 2002; 94: 1211–20.
25. Thomas C, Thomas L. Biochemical and hematologic indices in the diagnosis of functional iron deficiency. *Clin Chem* 2002; 48: 1066–76.