

Serie di Ematologia di Laboratorio - a cura del GdS-E SIMeL

La diagnosi di laboratorio della carenza di ferro

P. Doretto, P. Cappelletti

Patologia Clinica, Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera "S. Maria degli Angeli" di Pordenone

Riassunto

La valutazione del ferro sull'aspirato o biopsia midollare con colorazione di Perls rimane ancora oggi il *gold standard* per valutare i depositi di ferro. Tuttavia sono disponibili molti altri esami di laboratorio, sia biochimici che ematologici, meno invasivi e più pratici, utili per la diagnosi e la gradazione del deficit di ferro. Gli esami biochimici si basano sul metabolismo del ferro e permettono di individuare il deficit di ferro prima della comparsa dell'anemia. Gli esami ematologici, basati sulle caratteristiche dei globuli rossi valutate morfologicamente allo striscio periferico o come citogrammi o indici eritrocitari strumentali quali MCV e l'ampiezza della distribuzione dei volumi eritrocitari (RDW), sono più facilmente disponibili e meno costosi. Nuovi parametri quali CHr e %HYPO sono in grado di diagnosticare il deficit funzionale di ferro, prima che l'anemia sia presente. Nei soggetti anemici tali esami permettono di chiarire o confermare il tipo o la causa dell'anemia. Sfortunatamente non esiste nessun singolo esame "migliore" per la diagnosi di deficit di ferro con o senza anemia. Infatti ciascun esame che valuta lo stato marziale riflette modificazioni in differenti compartimenti del ferro corporeo (di deposito, di trasporto, metabolico-funzionale), è influenzato da differenti livelli di deplezione marziale e presenta una sovrapposizione tra valori normali e patologici. Il ricorso a test multipli con varie combinazioni possibili, tra cui la migliore sembra essere emoglobina, recettori solubili della transferrina e ferritina, migliora la specificità ma sottostima ancora il deficit di ferro valutato come misura della risposta emoglobinica al supplemento orale di ferro.

Summary

Laboratory diagnosis of iron deficiency

Nowadays the bone marrow biopsy or aspirate staining with Prussian blue-Perl's reaction remains the *gold standard* for the assessment of iron stores. Nevertheless, many other laboratory tests, either biochemical or haematologic, are available, less harmful and more practical, useful for diagnosis and classification of iron deficiency. The biochemical tests are based on iron metabolism and enable the identification of iron deficiency before the onset of anemia. The haematologic tests, based on morphological evaluation of red blood cells on blood films, scatter plots or red cell indices as MCV and red cell distribution width (RDW), are more readily available and less expensive. New parameters as CHr and %HYPO detect iron functional deficiency, before anaemia is present. In anaemic subjects such tests are used to confirm or clarify types or causes of anaemia. Unfortunately, it doesn't exist any "best" test for the diagnosis of iron deficiency with or without anaemia. In fact, each test for iron state evaluation reflects modifications in different compartments of body iron (stores, transport, metabolic-functional), is influenced by different degree of iron depletion and presents an overlap between normal and pathological values. A combination of multiple tests (the best combination would be haemoglobin, serum transferrin receptors, serum ferritin), improves specificity but still underestimates iron deficiency as observed by haemoglobin response to iron administration.

Key words: iron deficiency, iron-deficient erythropoiesis, serum ferritin, serum transferrin receptor.

La carenza di ferro

Il deficit di ferro (ID) è un insufficiente apporto, rispetto alle richieste, di ferro all'eritron e agli altri tessuti¹. È il più comune deficit nutrizionale nel mondo, sia nei Paesi sviluppati sia in via di sviluppo e rappresenta la principale causa di anemia (circa 2 miliardi di persone secondo WHO). Le conseguenze si hanno non solo sul piano ematologico, talora anche gravi quali l'aumentata mortalità materna e neonatale o l'aggravamento di sottostanti patologie polmonari o cardiovascolari in conseguenza dell'ipossia², ma possono coinvolgere il sistema immunitario, endocrino, muscolare e le funzioni neurologiche (ritardo mentale spesso irreversibile, apatia, anomalie comportamentali soprattutto nei bambini)^{3,4}. Il deficit di ferro si sviluppa tipicamente attraverso tre stadi sequenziali corrispondenti a livelli di gravità crescente, di cui l'anemia rappresenta solo lo stadio finale⁵⁻⁷: deplezione dei depositi (stadio I, prelatente), eritropoiesi ferrocarente (stadio II, latente o subclinico) e anemia sideropenica (IDA) (stadio III, manifesto). Nello stadio più precoce i depositi di ferro si esauriscono progressivamente (bilancio del ferro negativo), ma non ci sono effetti sulle funzioni essenziali del ferro perché è ancora sufficiente il ferro assorbito dall'intestino e quello rilasciato dall'eritrocateresi. Questa fase può essere caratterizzata da bassi livelli di ferritina sierica. Quando i depositi sono completamente esauriti si passa al secondo stadio in cui si sviluppa un deficit di ferro con compromissione della sintesi emoglobinica e dei processi enzimatici metabolici tissutali che può portare a delle anomalie nelle funzioni fisiologiche (quali una ridotta capacità lavorativa); questa fase è caratterizzata da bassi livelli di sideremia e di saturazione della transferrina (TSAT), aumento della transferrina, della protoporfirina libera eritrocitaria o zinco protoporfirina (ZPP) e del recettore solubile della transferrina (sTfR). L'emoglobina (Hb) e il volume corpuscolare medio (MCV) sono ridotti ma ancora nell'ambito di normalità ed eventualmente possono comparire nel sangue periferico delle emazie ipocromiche. Nell'ultimo e più severo stadio, l'unico determinabile con la concentrazione di emoglobina, l'apporto di ferro all'eritron è insufficiente a mantenere un'adeguata concentrazione di emoglobina che scende sotto i valori normali insieme con la diminuzione di MCV: si realizza una carenza assoluta con deplezione di ferro in tutti i distretti, che si manifesta come anemia sideropenica ipocromica microcitica, con TSAT <15% e ferritina <12 µg/L.

Il secondo stadio, quello dell'eritropoiesi ferrocarente, solitamente preso per indicare il deficit di ferro in assenza di anemia, è talora identificato come carenza funzionale di ferro perché coinvolge il compartimento funzionale o metabolico del ferro, rappresentato dalle sedi di utilizzo del ferro, in primis a livello dell'eritron. Il ridotto apporto di ferro all'eritron può realizzarsi non solo per la deplezione dei depositi di ferro, ma

anche in presenza di quantità di ferro adeguate od eccessive nei depositi ed è in quest'ultima accezione che viene utilizzato più correttamente il termine di deficit funzionale di ferro: ciò si verifica o per un blocco del ferro a livello macrofagico, sostenuto da citochine pro-infiammatorie che aumentano a livello cellulare l'immagazzinamento del ferro come ferritina e ne ostacolano la dismissione (come si verifica nelle malattie infiammatorie croniche), o per una forte stimolazione dell'eritropoiesi come nella terapia con eritropoietina (EPO), per cui il ferro liberato dai depositi e veicolato dalla transferrina non riesce a raggiungere con sufficiente rapidità gli eritroblasti in via di proliferazione. Tale situazione si associa a TSAT <20% con ferritina normale o aumentata (>100, in alcuni studi >500 µ/L), percentuale di eritrociti ipocromici (%HYPO) >10% (in alcuni studi >3-6%)^{8,9} e con contenuto di emoglobina reticolocitaria (CHr) <26 o 28 pg¹⁰.

La causa prevalente della carenza di ferro nel Nord America ed in Europa è un insufficiente apporto di ferro alimentare per una dieta incongrua nelle persone che richiedono un aumentato fabbisogno di ferro (donne in età fertile per la deplezione di ferro con le mestruazioni e la gravidanza, bambini e adolescenti durante le fasi di rapida crescita)^{11,12}; anche quando l'apporto dietetico è adeguato, un deficit può verificarsi per un insufficiente assorbimento di ferro, come nelle sindromi da malassorbimento, nelle ipo-acloridrie, nelle diete con sostanze che diminuiscono l'assorbimento del ferro (fosfati, fitati, ossalati, tannini), nel picacismo (ingestione di terra o argilla)¹¹. La seconda più comune causa di carenza marziale, specialmente nei maschi adulti e nelle donne in menopausa, è la perdita di sangue spesso cronica od occulta, dovuta ad interventi chirurgici, donazioni di sangue, dialisi, sanguinamenti gastrointestinali o uterini da traumi, neoplasie, displasie, malattie infiammatorie incluso il morbo di Crohn e la rettocolite ulcerosa, farmaci¹³⁻¹⁵. Nei Paesi sottosviluppati l'anemia sideropenica è 6-8 volte più frequente, risultato di una inadeguata nutrizione (dieta povera di carne) o di perdite gastroenteriche da parassitosi intestinali, in particolare l'ancilostomiasi e la schistosomiasi che interessano quasi un quinto della popolazione mondiale, soprattutto donne e bambini. Anemia sideropenica può verificarsi anche per perdita urinaria di ferro come nell'emoglobinuria parossistica notturna o nelle anemie emolitiche intravascolari acute (con emoglobinuria) o croniche (con emosiderinuria) o per perdita di ferro come emosiderina dal polmone nell'emosiderosi polmonare.

La diagnosi di carenza di ferro

La diagnosi di deficit di ferro è una diagnosi di laboratorio. In assenza di anemia il deficit di ferro è asintomatico e può rimanere tale anche con una lieve o moderata anemia se questa si è instaurata lentamente. I segni e i sintomi riferibili sia all'anemia sia alla carenza

di ferro nei tessuti compaiono in modo graduale e progressivo. L'astenia, il disturbo più frequentemente riferito, è aspecifico, comune al 20-30% delle prime visite mediche, raramente preso in considerazione nei soggetti non anemici.

La diagnosi deve essere accurata e precoce per distinguere tra un ID e un'anemia da malattia cronica (ACD) caratteristica delle infiammazioni, infezioni, connettiviti e neoplasie, e tra una ACD e una forma combinata ID/ACD, per prevenirne le complicanze sistemiche, perché può essere spia di una neoplasia gastroenterica, per evitare una inadeguata risposta alla terapia con EPO, perché l'anemia sideropenica risponde prontamente alla terapia^{16,17}. Oltre all'ACD, la diagnosi differenziale va posta nei confronti delle altre anemie microcittiche quali le talassemie (alfa e beta), la sferocitosi ereditaria, l'anemia saturnina, l'anemia da HbC o D, le anemie sideroblastiche, le anemie da carenza di vitamina B₆ e l'anemia da carenza proteica grave.

Gli esami di laboratorio disponibili per la diagnosi di carenza di ferro nei suoi diversi stadi sono molteplici e possono essere didatticamente catalogati come esami biochimici (sideremia, transferrina, ferritina, zinco-protoporfirina, recettore solubile della transferrina) ed esami ematologici (morfologia del midollo osseo e del sangue periferico, indici eritrocitari, indici reticolocitari).

Esami biochimici

Sideremia

La concentrazione sierica di ferro si riduce dopo che i depositi di ferro sono completamente esauriti e prima che diminuisca l'emoglobina, ed è quindi sensibile allo stadio di lieve deficit di ferro. Tuttavia il suo utilizzo è limitato da fattori analitici (metodo utilizzato e presenza di emolisi), dalle ampie variazioni da giorno a giorno (fino al 100% nelle 24 ore in soggetti sani e con valori più alti verso sera) e dalla mancanza di specificità: bassi valori si possono trovare in varie situazioni quali donazioni o perdite di sangue, gravidanza, infezioni, flogosi acute e croniche, shock, febbre, neoplasie, infarto miocardico¹⁸. La sideremia può transitoriamente aumentare dopo l'ingestione di carne o la terapia orale con ferro¹⁹.

Non essendo specifica come singola misura dello stato del ferro se non in casi estremi (valori molto bassi o molto alti), solitamente la sideremia è utilizzata in combinazione con altri parametri di misura dello stato del ferro. Poiché la sua utilità è condizionata da una situazione di alta prevalenza di sideropenia, in situazioni non complicate e aggiungendo poco al valore diagnostico della ferritinemia, si raccomanda di non usare questo test in aggiunta alla ferritina per la valutazione del deficit di ferro¹⁸.

Transferrina e total iron-binding capacity (TIBC)

La transferrina è la proteina di trasporto del ferro.

La sua determinazione viene generalmente richiesta insieme alla sideremia. Può essere misurata direttamente con metodo immunologico o essere espressa come capacità totale legante il ferro (TIBC) che rappresenta la quantità di ferro aggiunto che può essere legato in modo specifico dal plasma. In condizioni normali i due valori sono correlati ma non in alcune situazioni patologiche²⁰. La sintesi della transferrina è regolata dallo stato marziale e quindi aumenta (e indirettamente anche la TIBC) linearmente fino approssimativamente a valori di 400 µg/L nelle situazioni di deplezione dei depositi ed è ridotta quando i depositi sono aumentati²¹. La sua concentrazione è condizionata anche da altri fattori non correlati allo stato del ferro e che ne limitano l'utilizzo diagnostico: si riduce nelle infiammazioni, nelle infezioni, nelle epatopatie, nelle neoplasie, nella sindrome nefrosica e nella malnutrizione mentre aumenta in corso di terapia con contraccettivi orali. E' quindi un parametro specifico ma poco sensibile.

Saturazione transferrinica (TSAT)

La TSAT rappresenta la percentuale dei siti di transferrina legati dal ferro rispetto a quelli totali se le molecole della transferrina fossero tutte saturate, quindi il rapporto tra la sideremia e la TIBC espresso in percentuale. Se non si hanno i valori della TIBC ma quelli della transferrina, è possibile fare una stima teorica di quanto ferro sarebbe legato se la transferrina fosse completamente satura, considerando che 1 mg di transferrina trasporta al massimo 1,41 g di ferro. Pertanto:

$$TSAT = \text{Ferro } (\mu\text{g/dL}) / (\text{Tf } (\text{mg/dL}) \times 1.41) \times 100$$

oppure

$$TSAT = \text{Ferro } (\mu\text{g/dL}) / \text{Tf } (\text{mg/dL}) \times 70.9$$

Bassi valori di TSAT suggeriscono depositi di ferro ridotti. La sua riduzione si manifesta prima che si sviluppi l'anemia ma non in modo da individuare precocemente il deficit di ferro e pertanto è meno sensibile della ferritina²². Poiché riflette il ferro trasportato piuttosto che quello di deposito, è un indicatore dell'apporto del ferro alle sedi di utilizzo (eritron). Un valore di TSAT <16% è un indice accurato di eritropoiesi ferrocarente²³ ed è un utile marcatore per valutare il deficit funzionale di ferro, in cui la ferritina può essere normale. Fornisce inoltre informazioni aggiuntive rispetto ai due componenti della frazione: sul piano terapeutico a parità di sideremia la possibilità di incrementare il ferro di trasporto dipende dalla percentuale di Tf libera. Ha gli stessi limiti della sideremia e della transferrinemia (variazioni diurne e bassa specificità). Risulta anche ridotta nelle malattie infiammatorie e quindi non permette di discriminare tra deficit di ferro e anemia da malattia cronica. Pertanto valori normali o aumentati sono più utili nell'escludere la sideropenia di valori bassi nell'identificarli²⁴.

Ferritina

La concentrazione sierica della ferritina è una misura

ampiamente usata nella pratica clinica e per gli screening come marker affidabile e specifico dei depositi di ferro in soggetti sani e in condizioni stazionarie^{25,26}; misure su salassi ripetuti hanno evidenziato una stretta correlazione tra ferritina e ferro di deposito mobilizzabile dimostrando che 1 µg/L di ferritina corrisponde a 8-10 mg di ferro di deposito^{27,28}. Quando i depositi di ferro si esauriscono, i livelli sierici di ferritina diminuiscono, rendendo tale parametro il più precoce marker di deficit di ferro e la più utile singola misura dello stato del ferro. C'è una buona concordanza nella misura della ferritina sierica tra i numerosi kit commerciali disponibili che utilizzano varie metodiche (IRMA, EIA, ELISA)^{26,29} grazie all'introduzione nel 1985 dello standard di riferimento WHO³⁰.

Variationsi significative della ferritinemia si hanno nel corso dell'età e tra i sessi, per cui è necessario utilizzare intervalli di riferimento specifici³¹. Bambini e gravide hanno generalmente valori di ferritina vicini o nell'ambito del deficit di ferro. Nel secondo e terzo trimestre di gravidanza la ferritina si riduce anche quando i depositi midollari sono presenti e anche in corso di supplementazione di ferro, rendendo poco utile la sua determinazione⁶. Tende inoltre ad essere più bassa nelle donne rispetto agli uomini, per i più bassi depositi di ferro nelle donne. In entrambi i sessi c'è una distribuzione asimmetrica con una coda che si allunga verso valori più alti con l'età. Negli uomini la ferritina aumenta nella seconda decade, rimane quindi stabile e risale poi lentamente fino ai 65 anni. Nelle donne rimane bassa fino ai 45 anni per poi risalire con la menopausa e la cessazione delle mestruazioni e raggiungere gli stessi valori degli uomini verso i 60-70 anni¹⁸.

La concentrazione sierica di ferritina aumenta indipendentemente dai depositi di ferro, perdendo di fatto ogni utilità diagnostica, nelle situazioni in cui si comporta come proteina della fase acuta e come marker tumorale: infiammazioni, infezioni, neoplasie, epatopatie³². Aumenta inoltre nell'alcolismo, nelle trasfusioni, nelle terapie marziali per os, nell'ipertiroidismo e con i contraccettivi orali, mentre la carenza di ferro è la sola causa di una sua bassa concentrazione, escludendo il deficit di vitamina C e l'ipotiroidismo. Valori nell'ambito di normalità sono indicativi di sufficiente quantità di ferro solo in assenza di tali condizioni. C'è un generale consenso che concentrazioni di ferritina sierica <20 µg/L siano diagnostiche di assenza di depositi di ferro e di anemia sideropenica in pazienti anemici; i cut-off proposti variano in base alla prevalenza del deficit di ferro nella popolazione studiata (pazienti ricoverati, pazienti ambulatoriali, soggetti sani) e all'accuratezza della diagnosi (confronto con il metodo di riferimento, limite più basso dell'intervallo di riferimento, uso di criteri diagnostici multipli): da valori <5 µg/L nelle donne in età fertile³³ a valori <20-25 µg/L negli adulti³⁴. Il cut-off più comunemente usato per indicare l'assenza di depositi di ferro negli adulti è

12 µg/L³⁵⁻⁴⁰ mentre per i bambini varia con l'età, solitamente da 10 µg/L a 12 µg/L^{37,41-43}. Valori più alti vengono usati in Scandinavia (15-17 µg/L)⁴⁴⁻⁴⁷ per indicare sia l'assenza di depositi che il deficit di ferro. Nello studio di Hallberg et al.⁴⁵ su 207 donne di 38 anni, il deficit di ferro viene definito da valori di ferritina <16 µg/L (sensibilità 75% e specificità 98%, efficienza diagnostica 91%, rapportati alla presenza/assenza di ferro colorabile nel midollo): a questi valori non solo i depositi di ferro sono assenti ma sono già presenti i segni di un'eritropoiesi ferrocarente. Hb comincia a calare infatti molto precocemente durante lo sviluppo del deficit di ferro, con valori di ferritina di 25-40 µg/L. Il fatto che il 25% delle donne con deficit di ferro valutato come assenza di ferro colorabile nel midollo (gold standard) presentino valori di ferritina tra 16 e 30 µg/L potrebbe però essere legato più a problemi tecnici (campionamento e allestimento degli strisci) e di soggettività nella valutazione microscopica che a ridotta sensibilità della ferritina.

L'aumento della ferritina per fattori indipendenti dallo stato marziale rende più problematica la scelta del cut-off per escludere il deficit di ferro. I livelli proposti vanno da 30 µg/L a 75 µg/L, più elevati nell'anziano (>65 anni) che nel giovane per effetto del progressivo sviluppo di malattie infiammatorie⁴⁸⁻⁵⁰. In soggetti anemici cut-off di 30 µg/L⁵¹ e 40 µg/L⁵² forniscono un'ottima efficienza diagnostica (valore predittivo positivo del 92% e 98% rispettivamente), anche senza segni clinici di infezione o infiammazione, mentre negli anziani valori <30 µg/L hanno una sensibilità del 48% e una specificità del 100% e valori <65 µg/L una sensibilità dell'80% e una specificità del 98% per la diagnosi di deficit di ferro⁵³.

Un'altra condizione in cui la determinazione sierica della ferritina perde valore diagnostico è nelle situazioni di carenza funzionale di ferro, in cui si ha un'eritropoiesi ferrocarente perché la velocità di sottrazione del ferro transferrinico da parte dell'eritrone supera la velocità di immissione in circolo del ferro dai depositi, anche se normali o aumentati. Questa discrepanza tra disponibilità e richieste di ferro midollare si verifica tipicamente quando l'eritropoiesi è fortemente stimolata come nei soggetti trattati con EPO o dopo terapia endovenosa di ferro. Infatti la ferritina è prodotta e immessa in circolo dalle cellule del sistema reticolo endoteliale in dosi direttamente proporzionali al contenuto del piccolo pool labile intracellulare di ferro che è in equilibrio con i depositi di ferro e il compartimento metabolico; rapide variazioni di questo pool come nella terapia eritropoietinica o con ferro endovena provocano variazioni della ferritinemia indipendenti dai depositi³⁴. Infatti in soggetti sani trattati con EPO anche in associazione a terapia endovenosa con ferro si ha una rapida caduta della ferritinemia a valori inferiori dal 50 al 70% del livello base⁵⁵⁻⁵⁷; in questi soggetti già valori di ferritina <100 µg/L si associano a deficit fun-

zionale di ferro e ridotta risposta all'EPO⁵⁷. Sfortunatamente non è possibile l'utilizzo della ferritina come marker predittivo di risposta alla terapia con EPO in quei pazienti che presentano livelli base di ferritina "inappropriatamente alti" quali i dializzati e i neoplastici anemici. Due terzi dei pazienti con insufficienza renale cronica in dialisi rispondono alla terapia marziale endovenosa con correzione dell'anemia pur con livelli medi di ferritina (94 µg/L) sovrapponibile a coloro che non rispondono a tale terapia⁵⁸ e fino a livelli di ferritina di 800 µg/L oltre i quali è poco probabile che tali pazienti traggano beneficio dalla terapia marziale⁵⁹. Ciò ha portato a sviluppare degli algoritmi⁶⁰ e delle linee guida specifiche per i pazienti anemici con insufficienza renale cronica: c'è un generale consenso che livelli di ferritina <100 µg/L e di TSAT <20% siano considerati diagnostici di carenza assoluta di ferro e che livelli di ferritina ≥100 µg/L e di TSAT >20% rappresentino il target terapeutico con ferro endovena che deve essere raggiunto e mantenuto prima di iniziare la terapia con EPO e durante la sua prosecuzione^{59,61-63}. Anche nei pazienti neoplastici con anemia il livello sierico della ferritina non è in grado di predire la risposta all'EPO o di identificare il deficit funzionale di ferro, anche se è ragionevole ritenere che livelli di ferritina <200 µg/L siano predittivi della risposta alla terapia marziale endovena nella maggior parte dei pazienti sottoposti a terapia con EPO⁶⁴⁻⁶⁶.

Ferritina eritrocitaria e zincoprotorfirina

La ferritina eritrocitaria è stata proposta in alcuni studi al posto della ferritina sierica nel rivelare il deficit di ferro in pazienti con anemia delle malattie croniche⁶⁷⁻⁷⁰. Il suo scarso utilizzo è dovuto alla difficoltà del metodo, all'insensibilità a modificazione dinamiche dello stato del ferro e al fatto che valori molto bassi e significativi si raggiungono solo quando la maggior parte della popolazione eritrocitaria è stata rimpiazzata dalle nuove emazie ferro carenti. Quest'ultimo è anche un limite per l'utilizzo della ZPP, i cui livelli intraeritrocitari aumentano mano a mano che si riduce la disponibilità del ferro per la sintesi dell'eme. Per questo è stata proposta come utile e sensibile marker di eritropoiesi ferrocarente (anche se negli stadi più avanzati) nelle anemie delle malattie croniche, con depositi di ferro e ferritina sierica normali o aumentati: risolvendo la malattia di base il ferro di deposito è reso nuovamente disponibile per l'eritrono con conseguente progressiva riduzione della ZPP e della ferritina^{71,72}. In altri lavori la ZPP si è dimostrata di poca utilità nell'identificare l'eritropoiesi ferrocarente^{73,74}. Poiché i livelli aumentano lentamente con l'inizio della carenza di ferro, ZPP è elevata nelle fasi avanzate del deficit di ferro e il grado dell'aumento dipende più dalla durata che dall'entità del deficit: può quindi servire come screening per individuare forme moderate di ID senza anemia⁷⁵. Dato che la ZPP rimane nell'eritrocita fino alla sua morte, il

valore resta elevato anche nella prima fase della terapia marziale. La determinazione della ZPP è sensibile ad interferenze da farmaci e componenti plasmatici e ha problemi di specificità in quanto aumenta in situazioni diverse dal deficit di ferro quali l'intossicazione da piombo, le infezioni o infiammazioni, l'anemia emolitica e i difetti acquisiti nella sintesi dell'emoglobina come nelle mielodisplasie⁷⁶. Ha il vantaggio di essere stabile nell'individuo rispetto alle ampie variazioni diurne della sideremia e della TSAT e di essere facilmente misurata con un semplice ematofluorimetro che richiede solo un paio di gocce di sangue e una minima esperienza tecnica⁶. Per questo, anche se poco utilizzata nella pratica clinica, è ampiamente usata nelle indagini su popolazioni, soprattutto dove è comune il deficit di ferro e rare sono le infezioni, l'avvelenamento da piombo o altre anemie⁷⁷.

Recettore solubile della transferrina

La concentrazione sierica del sTfR è proporzionale alla quantità totale di TfR presenti sulle cellule dell'organismo; poiché la più elevata concentrazione di recettori è presente sulla membrana dei precursori eritroidi (80% della concentrazione totale di TfR), il valore del recettore solubile rispecchia principalmente l'attività eritroide: è ridotto nei casi di ipoplasia eritroide (anemia aplastica, chemioterapia, insufficienza renale) mentre è aumentato nell'iperplasia (anemie emolitiche, talassemie)⁷⁸. Fornendo una stima della massa dell'eritrono, che è inversamente correlata alla concentrazione sierica di EPO, ha permesso di valutare meglio la relazione tra i livelli di emoglobina e la concentrazione sierica di EPO⁷⁹; un valore inappropriatamente basso di sTfR rispetto al grado di anemia è indicativo di riduzione dell'attività eritropoietinica midollare⁸⁰. La sintesi intracellulare e di conseguenza i livelli sierici del recettore aumentano sensibilmente nella carenza di ferro (da tre a quattro volte la norma)⁸¹. Pertanto in assenza di condizioni di iperplasia eritroide l'aumento del recettore solubile è espressione di deficit di ferro a livello dell'eritrono, cioè di eritropoiesi ferrocarente. Con flebotomie controllate, i livelli sierici del recettore rimangono normali e insensibili all'eritropoiesi indotta dall'EPO endogena finché i depositi di ferro non sono depleti (ferritina <12 µg/L) ed emerge una situazione di eritropoiesi ferrocarente con un progressivo aumento di sTfR proporzionale al deficit funzionale di ferro⁸². La ferritina sierica e il recettore solubile della transferrina possono quindi coprire l'intero spettro della carenza di ferro: la prima come il marker più sensibile e specifico della riduzione dei depositi e il secondo come il marker più sensibile di eritropoiesi ferrocarente⁵². Nel diagnosticare i deficit funzionali di ferro, anche con depositi marziali e concentrazione di ferritina nella norma, sTfR risulta più stabile della TSAT e più precoce della ZPP. La correlazione tra sTfR ed attività eritropoietica permette l'impiego del sTfR per il mo-

nitoregaggio della terapia con EPO in quanto la concentrazione si eleva in tempi molto brevi, quattro settimane prima rispetto all'aumento di emoglobina⁷⁹; valori normali o bassi di sTfR sarebbero predittivi della iniziale risposta alla terapia eritropoietinica in pazienti dializzati anemici⁸³. In altri studi il valore predittivo del sTfR nel predire la risposta alla terapia con EPO sarebbe modesto⁸⁴.

Il maggior vantaggio del sTfR è che la sua concentrazione non viene influenzata da processi infiammatori, infettivi o danni epatici e non varia con l'età, il sesso e lo stato di gravidanza⁸⁵; risulta quindi particolarmente utile nel discriminare tra pazienti con carenza di ferro (IDA e forme combinate IDA+ACD) in cui il valore è generalmente aumentato e quelli senza carenza di ferro (ACD) in cui il valore è generalmente normale, con una elevata efficienza diagnostica nel dimostrare la carenza di ferro in caso di ACD (sensibilità sTfR = 94%)⁸⁶⁻⁸⁸; la sensibilità diagnostica risulta ancor più elevata (98%) calcolando l'indice R/F, cioè il rapporto tra il sTfR e il logaritmo della ferritina^{51,88,89}. Tale indice può anche essere usato per una stima accurata ed affidabile dei depositi marziali dell'organismo espressi in mg/kg di peso corporeo⁸⁹.

Il sTfR permette una corretta valutazione dello stato del ferro nei bambini, negli adolescenti, nelle gravide e negli atleti in attività in quanto in questi soggetti le riserve di ferro possono essere ridotte e risulta più utile evidenziare un deficit funzionale del ferro. In particolare in gravidanza la ferritina decresce rapidamente per la mobilizzazione del ferro dai depositi e l'espansione della massa eritrocitaria della madre e rimane bassa anche nel secondo e terzo trimestre pur con depositi midollari presenti e anche in corso di supplementazione orale, mentre la ZPP e MCV si modificano troppo lentamente per individuare l'esordio precoce del deficit di ferro⁹⁰. I limiti dell'utilizzo della determinazione di sTfR nella valutazione dello stato del ferro sono l'aumento senza segni di deficit di ferro in talune neoplasie quali i linfomi⁹¹ e la mancanza di una standardizzazione del metodo: diversi sono i metodi utilizzati (il più comune è quello ELISA) e non c'è uno standard di riferimento. Di conseguenza i valori ottenuti e gli intervalli di riferimento sono metodo specifici e non confrontabili tra loro¹⁹.

Esami ematologici

Esame del midollo osseo

L'aspirato midollare e/o la biopsia ossea con l'esecuzione della colorazione di Perls o al blu di Prussia permette di valutare l'accumulo di ferro nell'interstizio e nei macrofagi midollari e la presenza di sideroblasti: l'assenza di ferro colorabile permette la diagnosi di ID senza altri test di laboratorio. E' ancora considerato il gold standard per la diagnosi di ID, altamente specifico e ampiamente sperimentato, nonostante le sue limitazioni: metodo costoso ed invasivo, con possibili an-

che gravi conseguenze, soggettivo, richiede una lettura attenta e diligente, e una tecnica di colorazione meticolosa, con possibili errori di campionamento e di interpretazione (artefatti)^{33,45}. E' ancora utile se eseguito in condizioni standardizzate da operatori esperti, ma non proponibile routinariamente nella pratica clinica per il solo scopo di diagnosticare una sideropenia⁹².

Striscio periferico

Nell'anemia sideropenica cronica gli eritrociti sono piccoli ed ipocromici. La microcitosi compare nel vetrino prima che si abbia una riduzione di MCV. Un'altra caratteristica morfologica comunemente citata come favorente la diagnosi di IDA è la anisopoichilocitosi, anche se non marcata e, a differenza della talassemia, senza target cell.

In realtà tali affermazioni si basano su descrizioni aneddotiche piuttosto che su dati quantitativi. Un recente lavoro⁹³ ha dimostrato che caratteristici di IDA sono i precheratociti, definiti come eritrociti con 1 o + vacuoli distinti, dai margini affilati, aderenti alla membrana cellulare e pallore centrale conservato, e gli ellissociti (*pencil cell*), definiti come eritrociti ipocromici ed allungati, con l'asse maggiore 3 volte più lungo dell'asse minore. I precheratociti sono presenti nel 78% dell'IDA, nel 37% delle β -talassemie e nel 13% della ACD. Gli ellissociti sono presenti nel 70% dell'IDA, nel 30% delle β -talassemie e nel 13% della ACD. Di contro le target cell sono state rinvenute nel 95% di IDA, nel 93% delle β -talassemie e nel 65% della ACD, mentre la punteggiatura basofila è stata trovata solo nel 17% delle β -talassemie (5% IDA e 3% ACD). Le conclusioni del lavoro, pur portando dati quantitativi a supporto dell'uso di precheratociti ed ellissociti come suggestioni di diagnosi di IDA e a negazione dell'importanza di target cell e punteggiatura basofila come suggestioni di diagnosi di β -talassemia, sono che questi dati morfologici non possono essere utilizzati come criteri maggiori per la diagnosi delle anemie microcittiche ma solo come aiuto diagnostico al momento dell'esame morfologico dello striscio di sangue periferico.

Per quanto affidabile in mani esperte, quindi, l'esame morfologico dello striscio periferico non ha un rapporto costo beneficio tale da essere proposto nella pratica routinaria come metodo per individuare un'eritropoiesi ferrocarente, ampiamente sostituito in questo dai parametri eritrocitari forniti dagli strumenti ematologici automatizzati⁹⁴. Nel lavoro precedentemente citato⁹³, in effetti, indici eritrocitari hanno un maggior potere discriminatorio rispetto alla morfologia nella definizione dell'anemia microcittica. MCHC al cut-off di 31 ng/dL ha dimostrato una sensibilità del 90% ed una specificità dell'87% per IDA vs β -talassemia e una sensibilità del 90% ed una specificità del 80% per IDA vs ACD. RDW al cut-off di 18 fL (tecnologia ADVIA Siemens®) ha dimostrato una sensibilità del 82% ed una specificità dell'89% per IDA vs β -talasse-

mia e una sensibilità dell'82% ed una specificità del 40% per IDA vs ACD. I precheratociti, viceversa, al cut-off di 0.35 per 1000 eritrociti hanno dimostrato una sensibilità del 67.5% ed una specificità del 73% per IDA vs β -talassemia e una sensibilità del 67.5% ed una specificità del 97.6% per IDA vs ACD. Ed, infine, gli ellisociti al cut-off di 0.5 per 1000 eritrociti hanno dimostrato una sensibilità del 65% ed una specificità dell'87% per IDA vs β -talassemia e una sensibilità del 65% ed una specificità del 97.5% per IDA vs ACD.

D'altra parte è stato pubblicato un solo lavoro comparativo⁹⁵ tra indici ematologici e biochimici e morfologia periferica che dimostra correlazioni tra alterazioni morfologiche ed indici eritrocitari, mantenute con il peggiorare dell'anemia. In particolare sono state dimostrate una relazione inversa tra presenza e numero di ellisociti e MCH e di target cell e MCV, rispettivamente, ed una relazione positiva tra dacriociti e RDW.

Indici eritrocitari

Gli indici eritrocitari tradizionali (MCV, MCH, MCHC, RDW) sono stati ampiamente utilizzati come misure indirette del compartimento funzionale del ferro ma hanno lo svantaggio di essere degli indicatori relativamente tardivi del deficit di ferro e di non permettere una sicura differenziazione con altre situazioni di microcitosi come la talassemia. In particolare RDW è soggetto ad artefatti, non è misurato omogeneamente tra i vari strumenti ed anche tra strumenti con lo stesso metodo ed è di significato clinico incerto (per i diversi intervalli di riferimento dei vari strumenti e per la bassa sensibilità clinica nella differenziazione tra sideropenie e talassemie)⁹⁴. Nuovi parametri eritrocitari forniti dagli analizzatori ematologici quali %HYPO (percentuale di emazie con concentrazione di emoglobina <28 g/dL) e %MICRO (percentuale di emazie con volume <60 fL) si sono dimostrati utili nella diagnostica differenziale tra anemia sideropenica e trait β -talassemico, con prevalenza di emazie ipocromiche nel deficit di ferro e di emazie microciticche nella talassemia⁹⁶. In particolare il rapporto %MICRO/%HYPO con un cut-off di 0.9 ha un'efficienza diagnostica nel discriminare le due patologie del 92,4%⁹⁷, superiore alle altre formule che utilizzano il conteggio eritrocitario e gli indici eritrocitari convenzionali da soli^{98,99} o combinati in varie formule¹⁰⁰⁻¹⁰².

La percentuale delle emazie ipocromiche (valori normali <2.5%) si è dimostrata un utile parametro nella valutazione del deficit funzionale di ferro, tanto da essere proposto insieme con CHr come gold standard per la diagnosi di eritropoiesi ferrocarenziale: infatti il contenuto di emoglobina degli eritrociti riflettendo l'equilibrio tra ferro ed eritropoiesi, permette di valutare la disponibilità di ferro direttamente nella sede di sintesi dell'emoglobina¹⁰³. Considerando la vita media eritrocitaria di 120 giorni circa, %HYPO fornisce informazioni su un periodo di alcuni mesi e quindi è un indicatore tardivo di deficit funzionale di ferro. Valori

aumentati di %HYPO indicano lo sviluppo di un'eritropoiesi ferro carente nei dializzati⁸ e nei soggetti sani trattati con EPO⁷³. Numerosi altri lavori hanno dimostrato l'utilità di tale parametro per il monitoraggio dello stato del ferro e la necessità di supplementazione di ferro nei pazienti dializzati in terapia con EPO¹⁰⁴⁻¹⁰⁷. Le linee guida della Società Italiana di Nefrologia e della National Kidney Foundation hanno proposto come cut-off diagnostico di deficit funzionale di ferro un valore di %HYPO >10%^{62,108}. Valori <10% con ferritina bassa indicano un apporto di ferro all'eritronc ancora sufficiente per una normale emoglobinnizzazione pur con i depositi depleti¹⁰⁹. %HYPO si è anche dimostrato utile nel predire la risposta alla terapia con EPO e con ferro endovena nei pazienti dializzati⁹. In altri studi invece il valore di %HYPO è stato ridimensionato sia per problematiche tecniche relative alla temperatura e all'immagazzinamento dei campioni, sia perché un incremento apprezzabile delle emazie ipocromiche richiede un prolungato periodo di eritropoiesi ferrocarente e può verificarsi anche quando c'è una semplice reticolocitosi^{10,110,111}.

Indici reticolocitari

Poiché i reticolociti immessi in circolo maturano ad eritrociti in 18-36 ore, essi forniscono in tempo reale una valutazione dello stato funzionale dell'eritropoiesi, anche se nella fase precoce di stimolazione dell'eritropoiesi il loro numero riflette più il rilascio dal midollo dei reticolociti immaturi (reticolociti da stress) che la vera espansione dell'eritropoiesi¹¹²⁻¹¹⁴. Il conteggio assoluto reticolocitario è usato per il monitoraggio della terapia endovena con ferro e per valutare la risposta alla terapia con EPO insieme alla determinazione dell'Hb: un incremento di Hb >1.0 g/dL o un aumento nel conteggio reticolocitario >40 x 10⁹/L dopo 4 settimane di terapia indicano una risposta positiva alla terapia con EPO⁶⁵. Il conteggio reticolocitario è meno utile nel monitoraggio della terapia orale con ferro e nell'individuare la carenza funzionale di ferro (che si può verificare quando l'eritropoiesi è fortemente stimolata come nella terapia con EPO, folati e vitamina B₁₂) perché l'aumento è modesto e tardivo. In questi casi sono più utili gli indici reticolocitari forniti dall'analisi automatizzata con strumenti dedicati o con analizzatori ematologici, che comprendono tra l'altro il volume reticolocitario (MCVr), la concentrazione emoglobinica reticolocitaria (MCHMr), il CHr, la maturità e la frazione immatura dei reticolociti¹¹⁵⁻¹¹⁸. Gli indici reticolocitari sono in grado di determinare un'eritropoiesi ferrocarente in uno stadio più precoce rispetto agli indici eritrocitari usati^{114,119,120}.

CHr è il più precoce marker di deficit funzionale di ferro, considerato insieme a %HYPO il gold standard di eritropoiesi ferro carente. La sua utilità è stata dimostrata nella valutazione dello stato del ferro nei dializzati^{10,121}, nella diagnosi di deficit di ferro nei bambini¹⁷, nelle anemie da malattie croniche¹⁰³ e nella diagnosi e

nel trattamento di vari disordini ematologici¹¹⁸. In soggetti sani trattati con EPO si assiste ad una precoce e significativa diminuzione di CHr, espressione del deficit funzionale¹²²; la terapia con ferro endovena abolisce la produzione di reticolociti ipocromici ed aumenta la quantità di Hb contenuta nei reticolociti⁵⁶. Nei pazienti dializzati la combinazione di %HYPO <10% e CHr ≤29 pg ha la migliore capacità discriminante nel predire quali tra i dializzati in terapia di mantenimento con EPO risponderanno alla terapia endovenosa con ferro⁹. La gestione della terapia marziale endovenosa nello stesso tipo di pazienti con CHr piuttosto che con ferritina e TSAT riduce in modo sostanziale la terapia con ferro endovena¹²³. I valori base di CHr e dei reticolociti ad alta fluorescenza confrontati con le loro variazioni alla 2° e 4° settimana di terapia marziale endovenosa permette di identificare correttamente il deficit di ferro e la risposta alla terapia marziale, con una sensibilità del 96% e una specificità del 100% in quest'ultimo caso¹²⁴. CHr si è dimostrato utile nella diagnosi di deficit di ferro in presenza di infiammazione e di anemia da malattia cronica, dove falliscono i principali parametri biochimici in quanto influenzati dalla risposta di fase acuta.

Un nuovo approccio al problema è stato proposto da Thomas et al.¹⁰³: definito il deficit funzionale di ferro con valori di CHr <28 pg e di %HYPO >5% in base alla distribuzione di questi parametri nella popolazione di controllo, i marker biochimici ed in particolare sTfR/F, valutati in pazienti senza e con infiammazione, hanno prestazioni molto migliori nella diagnosi di ID in assenza di infiammazione che con infiammazione, con un cut-off per sTfR/F di 1.5 nel semplice deficit di ferro e di 0.8 per il deficit combinato. Correlando in un semplice plot i valori di CHr e di sTfR nei pazienti con deficit di ferro e quelli con deficit di ferro e infiammazione si ottengono sulla base dei rispettivi valori di cut-off 4 quadranti che corrispondono a 4 differenti situazioni: depositi pieni ed eritropoiesi normale, depositi ridotti ma senza ancora un'eritropoiesi ferrocarente, deplezione dei depositi e deficit funzionale di ferro ed infine deficit funzionale di ferro con depositi pieni. In base al posizionamento dei singoli pazienti nei vari quadranti si può decidere per un'eventuale terapia marziale o con EPO.

CHr si è dimostrato essere anche il parametro con maggiore capacità predittiva per la diagnosi di deficit di ferro e di IDA in una popolazione di bambini piccoli (età media 2.9 anni) confrontato con ferritina, TfR e ZPP; la probabilità stimata per il deficit di ferro era >90% con CHr <20 pg e del 50% con CHr <24 pg, mentre era virtualmente assente per CHr >29 pg¹⁷. Le limitazioni di CHr nella valutazione dello stato marziale sono rappresentate dalle talassemie che presentano un valore molto basso di CHr, dai pazienti in chemioterapia che frequentemente sviluppano un transitoria eritropoiesi megaloblastica da deficit di folati con aumentato MCVr e CHr, dal fatto che è fornito solo da

una strumentazione ematologica e dal fatto che non si è dimostrato ancora con evidenza che l'utilizzo possa comportare un netto miglioramento del rapporto costo-efficacia nella terapia con EPO¹⁹.

Conclusioni

Nei soggetti anemici gli esami di laboratorio permettono di definire la presenza di anemia e di chiarire il tipo o la causa dell'anemia. Alcuni di essi, inoltre, sono in grado di evidenziare le fasi precoci della carenza di ferro. Tuttavia, sfortunatamente, non esiste nessun singolo esame "migliore" per la diagnosi di deficit di ferro con o senza anemia. Infatti ciascun esame che valuta lo stato marziale riflette modificazioni in differenti compartimenti del ferro corporeo (di deposito, di trasporto, metabolico-funzionale), è influenzato da differenti livelli di deplezione marziale e presenta una sovrapposizione tra valori normali e patologici. Il ricorso a test multipli con varie combinazioni possibili, tra cui la migliore sembra essere Hb, sTfR e ferritina, migliora la specificità ma sottostima ancora il deficit di ferro valutato come misura della risposta emoglobinica al supplemento orale di ferro (incremento di almeno 1 g/dL di Hb o del 3% di Ht in 3-4 settimane di terapia orale con ferro). Infine, la qualità dei dati sui quali si fondano le raccomandazioni sull'utilizzo della diagnostica di laboratorio per la diagnosi di carenza di ferro non sono, per lo più, *evidence-based* ma *consensus-based*. In effetti dati ben fondati esistono solo per la ferritina, in relazione al rapporto¹²⁵ tra la sua concentrazione sierica e il contenuto midollare di ferro, che ha consentito di identificare livelli decisionali per il "rule in" e il "rule out" di carenza di ferro, e al significato¹²⁶ del dato di concentrazione ematica rispetto alla probabilità pre-test. Dei molteplici nuovi esami suggeriti non esistono studi di elevata "evidenza", anche per la limitazione indotta dalle caratteristiche strumento-dipendenti di buona parte di essi.

Bibliografia

1. Finch CA, Huebers H. Perspectives in iron metabolism. *N Engl J Med* 1982; 306:1521-4.
2. Dallman PR. Iron deficiency: does it matter? *J Intern Med* 1989; 226(5): 367-72.
3. Lozoff B. Behavioral alterations in iron deficiency. *Adv Pediatr* 1988; 35:331-59.
4. Anderson AC. Iron poisoning in children. *Curr Opin Pediatr* 1994; 6:289-94.
5. Fairbanks VF, Beutler E. Iron deficiency. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, eds. *Williams Hematology*. New York: McGraw-Hill; 1995.
6. Cook JD, Skikne BS. Iron deficiency: definition and diagnosis. *J Intern Med* 1989; 226:349-55.
7. Suominen P, Punnonen K, Rajamaki A, et al. Serum transferrin receptor and receptor-ferritin index identify healthy subject with subclinical iron deficits. *Blood* 1998; 8:2934-9.
8. Macdougall IC, Cavill I, Hulme B, et al. Detection of functional iron deficiency during erythropoietin treatment:

- a new approach. *Br Med J* 1992; 304:225-6.
9. 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.
 10. Fishbane S, Dalgano C, Langley LC Jr, et al. Reticulocyte hemoglobin content in the evaluation of iron status in hemodialysis patients. *Kidney Int* 1997; 52:217-22.
 11. Adamson JW. Normal iron physiology. *Semin Dial* 1999; 12:219-23.
 12. Looker AC, Dallman PR, Carroll MD, et al. Prevalence of iron deficiency in the United States. *JAMA* 1997; 277: 973-6.
 13. Rockey DC, Cello JP. Evaluation of gastrointestinal tract in patient with iron deficiency anemia. *N Engl J Med* 1993; 329:1691-5.
 14. Cook IJ, Pavli P, Riley J, et al. Gastrointestinal investigation of iron deficiency anaemia. *Br Med J* 1986; 292: 1380-2.
 15. Joosten E, Ghesquiere B, Linthoudt H, et al. Upper and lower gastrointestinal evaluation of elderly inpatients who are iron deficiency. *Am J Med* 1999; 107:24-9.
 16. Ferguson BJ, Skikne BS, Simpson KM, et al. Serum transferrin receptor distinguishes the anemia of chronic disease from iron deficiency anemia. *J Lab Clin Med* 1992; 19:385-90.
 17. Brugnara C, Zurakowski D, Di Canzio J, et al. Reticulocyte hemoglobin content to diagnose iron deficiency in children. *JAMA* 1999; 281:2225-30.
 18. Cook JD, Finch CA, Smith NJ. Evaluation of the iron status of a population. *Blood* 1976; 48:449-55.
 19. Brugnara C. Iron deficiency and erythropoiesis: new diagnostic approaches. *Clin Chem* 2003; 49:1573-8.
 20. Gambino R, Desvarieux E, Orth M, et al. The relation between chemically measured total iron-binding capacity concentrations and immunologically measured transferrin concentrations in human serum. *Clin Chem* 1997; 43:2408-12.
 21. Goodnough LT, Skikne B, Brugnara C. Erythropoietin, iron and erythropoiesis. *Blood* 2000; 96:823-33.
 22. Wu AC, Lesperance L, Bernstein H. Screening for iron deficiency. *Pediatr Rev* 2002; 23:171-8.
 23. Bothwell TH, Charlton RW. Current problems of iron overload. *Recent Results Cancer Res* 1979; 69:87-95.
 24. Cook JD. Iron-deficiency anemia. *Baillieres Clinical Haematol* 1994; 7:787-804.
 25. Jacobs A, Miller F, Worwood M, et al. Ferritin in the serum of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload. *Br Med J* 1972; 4:206-8.
 26. Lipschitz DA, Cook JD, Finch CA. A clinical evaluation of serum ferritin as an index of iron store. *N Engl J Med* 1974; 290:1213-6.
 27. Birgegard G, Hogman C, Killander A, et al. Serum ferritin and erythrocyte 2,3-DPG during quantitated phlebotomy and iron treatment. *Scand J Haematol.* 1977; 19:327-33.
 28. Jacob RA, Sandstead HH, Klevay LM et al. Utility of serum ferritin as a measure of iron deficiency in normal males undergoing repetitive phlebotomy. *Blood* 1980; 56:786-91.
 29. Stacy DL, Han P. Serum ferritin measurement and the degree of agreement using four techniques. *Am J Clin Pathol* 1992; 98:511-5.
 30. International Committee for Standardization in Haematology (expert panel on iron). Proposed international standard of human ferritin for the serum ferritin assay. *Br J Haematol* 1985; 61:61-3.
 31. Vicente C, Porto G, De Sousa M. Method for establishing serum ferritin reference values depending on sex and age. *J Lab Clin Med* 1990; 116:779-84.
 32. Leggett BA, Brown NN, Brjant SJ, et al. Factors affecting the concentrations of ferritin in serum in a healthy Australian population. *Clin Chem* 1990; 36:1350-5.
 33. Provan D. Mechanism and management of iron deficiency anaemia. *Br J Haematol* 1999; 105(suppl 1): 19-26.
 34. Harju E, Pakarinen A, Larmi T. A comparison between serum ferritin concentration and the amount of bone marrow stainable iron. *Scan J Clin Lab Invest* 1984; 44:555-6.
 35. Cook JD, Lipschitz DA, Miles LEM, et al. Serum ferritin as a measure of iron stores in normal subjects. *Am J Clin Nutr* 1974; 27:681-7.
 36. Strain JJ, Thompson KA, Barker ME, et al. Iron sufficiency in the population of Northern Ireland: estimates from blood measurements. *Br J Nutr* 1990; 64:219-24.
 37. Preziosi P, Hercberg S, Galan P, et al. Iron status of a healthy French population: factors determining biochemical markers. *Ann Nutr Metab* 1994; 38:192-202.
 38. Galan P, Hercberg S, Soustre Y, et al. Factors affecting iron stores in French female students. *Hum Nutr Clin Nutr* 1985; 39:279-87.
 39. Fogelholm M, Alopaeus K, Silvennoinen T, et al. Factors affecting iron status in non-pregnant women from urban south Finland. *Eur J Clin Nutr* 1993; 47:567-74.
 40. Olsson KS, Marsell R, Ritter B, et al. Iron deficiency and iron overload in Swedish male adolescents. *J Intern Med* 1995; 237:187-94.
 41. English RM, Bennett SA. Iron status of Australian children. *Med J Aust* 1990; 152:582-6.
 42. Grant GA. Prevalence of iron deficiency in rural pre-school children in Northern Ireland. *Br J Gen Pract* 1990; 40:112-3.
 43. Kenney MA, McCoy JH, Kirby AL, et al. Nutrients supplied by food groups in diets of teenaged girls. *J Am Diet Assoc* 1986; 86:1549-55.
 44. Borch-Johnsen B, Meltzer HM, Stenberg V, et al. Iron status in a group of Norwegian menstruating women. *Eur J Clin Nutr* 1990; 44:23-8.
 45. Hallberg L, Bengtsson C, Lapidus L, et al. Screening for iron deficiency: an analysis based on bone-marrow examination and serum ferritin determinations in a population sample of women. *Br J Haematol* 1993; 86: 787-98.
 46. Milman N, Kirchoff M. Iron stores in 1433, 30- to 60-year-old Danish males. Evaluation by serum ferritin and haemoglobin. *Scand J Clin Lab Invest* 1991; 51:635-41.
 47. Milman N, Kirchoff M. Iron stores in 1359, 30- to 60-year-old Danish women: evaluation by serum ferritin and hemoglobin. *Ann Hematol* 1992; 64:22-7.
 48. Holyoake TL, Stott DJ, McKay PJ. Use of plasma ferritin concentration to diagnose iron deficiency in elderly patients. *J Clin Pathol* 1993; 46:857-60.
 49. McKay PJ, Stott DJ, Holyoake T, et al. Use of the erythro-

- gram in the diagnosis of iron deficiency in elderly patients. *Acta Haematol* 1993; 89:169-73.
50. Joosten E, Dereymaeker L, Pelemans W, et al. Significance of a low serum ferritin level in elderly in-patients. *Postgrad Med J* 1993; 69:397-400.
 51. Punnonen K, Irjala K, Rajamaki A. Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency. *Blood* 1997; 89:1052-7.
 52. Mast AE, Blinder MA, Gronowski AM, et al. Clinical utility of the soluble transferrin receptor and comparison with serum in several population. *Clin Chem* 1998; 44:45-51.
 53. Goncalvesova E, Vahancik A, Cernak P. Significance of laboratory examinations in the diagnosis of iron-deficiency anemia in older persons. *Vnitr Lek* 1992; 38:1201-7.
 54. Horl WH. How to get the best out of r-HuEPO. *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10(suppl 2):92-5.
 55. Skikne BS, Cook JD. Effect of enhanced erythropoiesis on iron absorption. *J Lab Clin Med* 1992; 120:746-51.
 56. Major A, Mathez-Loic F, Rohling R, et al. The effect of intravenous iron on the reticulocyte response to recombinant human erythropoietin. *Br J Haematol* 1997; 98:292-4.
 57. Brugnara C, Colella GM, Cremens J, et al. Effects of subcutaneous recombinant human erythropoietin in normal subjects: development of decreased reticulocyte hemoglobin content and iron-deficient erythropoiesis. *J Lab Clin Med* 1994; 123:660-4.
 58. Taylor JE, Peat N, Porter C, et al. Regular, low-dose intravenous iron therapy improves response to erythropoietin in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11:1079-108.
 59. National Kidney Foundation. *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative: clinical practice guidelines for anemia of chronic kidney disease, 2000*. *Am J Kidney Dis* 2001; 37(suppl 1):S182-S238.
 60. Kaufman JS, Reda DJ, Fye CL, et al. Subcutaneous compared with intravenous erythropoietin in patients receiving hemodialysis. *N Engl J Med* 1998; 339:578-83.
 61. National Kidney Foundation. *Dialysis Outcomes Quality Initiative: clinical practice guidelines for the treatment of anemia of chronic renal failure*. *Am J Kidney Dis* 1997; 30:192-237.
 62. Società Italiana di Nefrologia. *Linee guida per il trattamento dell'anemia nell'insufficienza renale cronica*. *Giorale Italiano di Nefrologia* 2003; 20:61-83.
 63. Revised European best practice guidelines for the management of anemia in patients with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19:1029-346.
 64. Cazzola M, Messinger D, Battistel V, et al. Recombinant human erythropoietin in the anemia associated with multiple myeloma or non-Hodgkin lymphoma: dose finding and identification of predictor of response. *Blood* 1995; 86:4446-53.
 65. Henry D, Abels R, Larholt K. Prediction of response to recombinant human erythropoietin (r-HuEPO/Epoetin-a) therapy in cancer patients. *Blood* 1995; 85:1676-8.
 66. Kasher C, Terhaar A, Fossa A, et al. Recombinant human erythropoietin in the treatment of cancer-related anemia. *Eur J Haematol* 1997; 58:251-6.
 67. Balaban EP, Sheean RG, Demian SE, et al. Evaluation of bone marrow iron stores in anemia associated with chronic disease: a comparative study of serum and red cell ferritin. *Am J Hematol* 1993; 42:177-81.
 68. Galan P, Sangare N, Preziosi P, et al. Is basic red cell ferritin a more specific indicator than serum ferritin in the assessment of iron stores in the elderly? *Clin Chim Acta* 1990; 189:156-62.
 69. Brunati C, Piperno A, Guastoni C, et al. Erythrocyte ferritin in patients on chronic hemodialysis treatment. *Nephron* 1990; 54:219-23.
 70. Caravaca F, Vagage JM, Aparicio A. Assessment of iron status by erythrocyte ferritin in uremic patients with or without recombinant human erythropoietin therapy. *Am J Kidney Dis* 1992; 20:249-54.
 71. Hastka J, Lasserre JJ, Schwarzbeck A, et al. Laboratory tests for iron status: correlation or common sense. *Clin Chem* 1996; 42:718-24.
 72. Hastka J, Lasserre JJ, Schwarzbeck A, et al. Zinc protoporphyrin in anemia of chronic disorders. *Blood* 1993; 81:1200-4.
 73. Brugnara C, Chambers LA, Malynne E, et al. Red blood cell regeneration induced by subcutaneous recombinant erythropoietin: iron deficient erythropoiesis in replete subjects. *Blood* 1993; 81:956-64.
 74. Garrett S, Worwood M. Zinc protoporphyrin iron-deficient erythropoiesis. *Acta Haematol* 1994; 91:21-5.
 75. Yip R, Schwartz S, Deinard A. Screening for iron deficiency with erythrocyte protoporphyrin test. *Pediatrics* 1983; 72:214-9.
 76. Hastka J, Lasserre JJ, Schwarzbeck A, et al. Washing erythrocytes to remove interferents in measurements of zinc protoporphyrin by front-face hematofluorometry. *Clin Chem* 1992; 38:2184-90.
 77. WHO, UN Children's Fund and UN University. *Iron deficiency anemia. Assessment, prevention and control. A guide for programme managers*. Geneva, World Health Organization, 2001 (document WHO/NHD/01.3).
 78. Beguin Y. The soluble transferrin receptor: biological aspects and clinical usefulness as quantitative measure of erythropoiesis. *Haematologica* 1992; 77:1-10.
 79. Cazzola M, Guarnone R, Cerani P, et al. Red blood cell precursor mass as an independent determinant of serum erythropoietin level. *Blood* 1998; 91:2139-45.
 80. Corazza F, Beguin Y, Bergmann P, et al. Anemia in children with cancer is associated with decreased erythropoietic activity and not with inadequate erythropoietin production. *Blood* 1998; 92:1793-8.
 81. Huebers HA, Beguin Y, Pootrakul P, et al. Intact transferrin receptors in human plasma and their relation to erythropoiesis. *Blood* 1990; 75:102-7.
 82. Skikne BS, Flowers CH, Cook JD. Serum transferrin receptor: a quantitative measure of tissue iron deficiency. *Blood* 1990; 75:1870-6.
 83. Beguin Y, Loo M, R'Zik S, et al. Early prediction of response to recombinant human erythropoietin in patients with the anemia of renal failure by transferrin receptor and fibrinogen. *Blood* 1993; 82:2010-6.
 84. Cook JD, Skikne BS, Baynes RD. Serum transferrin receptor. *Annu Rev Med* 1993; 44:63-74.
 85. Kohgo Y, Nishisato T, Kondo H, et al. Circulating transferrin receptor in human serum. *Br J Haematol* 1986; 64:277-81.

86. Punnonen K, Irjala K, Rajamaki A. Iron deficiency is associated with high concentrations of transferrin receptor in serum. *Clin Chem* 1994; 40:774-6.
87. Baynes RD, Cook JD. Current issues in iron deficiency. *Curr Opin Hematology* 1996; 3:145-9.
88. Suominen P, Punnonen K, Rajamaki A, et al. Evaluation of new immunoenzymometric assay for measuring transferrin receptor to detect iron deficiency in anemic patients. *Clin Chem* 1997; 43:1641-6.
89. Cook JD, Flowers CH, Skikne BS. The quantitative assessment of body iron. *Blood* 2003; 101:3359-63.
90. Carriaga MT, Skikne BS, Finley B, et al. Serum transferrin receptor for the detection of iron deficiency in pregnancy. *Am J Clin Nutr* 1991; 54:1077-81.
91. Bjerner J, Amlie LS, Rusten LS, et al. Serum level of soluble transferrin receptor correlate with severity of disease but not with iron stores in patients with malignant lymphomas. *Tumor Biol* 2002; 23:146-53.
92. Barron BA, Hoyer JD, Tefferi A. A bone marrow report of absent stainable iron is not diagnostic of iron deficiency. *Ann Hematol* 2001; 80:166-69.
93. Harrington AM, Ward PCJ, Kroft SH. Iron deficiency anemia, α -thalassemia minor, and anemia of chronic disease. A morphologic reappraisal. *Am J Clin Pathol* 2008; 129:466-71.
94. Cook JD. Diagnosis and management of iron-deficiency anemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2005; 18:319-32.
95. Rodgers MS, Chang CC, Kass L. Elliptocytes and tailed poikilocytes correlate with severity of iron-deficiency anemia. *Am J Clin Pathol* 1999; 111:672-5.
96. Mercantini F. Screening rapido tra microcitosi da carenza marziale e da beta-talassemia eterozigote. *Clin Lab* 1990; 14:123-6.
97. D'Onofrio G, Zini G, Ricerca BM, et al. Automated measurement of red blood cell microcytosis and hypochromia in iron deficiency and α thalassaemia trait. *Arch Pathol Lab Med* 1992; 116:84-9.
98. Klee GG, Fairbanks VF, Pierre RV, et al. Routine erythrocyte measurements in diagnosis of iron-deficiency anemia and thalassaemia minor. *Am J Clin Pathol* 1975; 66: 870-7.
99. Bessman DB, Fenstein DI. Quantitative anisocytosis as a discriminant between iron-deficiency and thalassaemia minor. *Blood* 1979; 53:288-93.
100. England JM, Fraser PM. Differentiation of iron deficiency from thalassaemia trait by routine blood count. *Lancet* 1973; 1:449-52.
101. Mentzer WC. Differentiation of iron deficiency from thalassaemia trait. *Lancet* 1978; 1:882.
102. Srivastava PC, Bevington JM. Iron deficiency and/or thalassaemia trait. *Lancet* 1978; 1:832.
103. Thomas C, Thomas L. Biochemical markers and hematologic indices in the diagnosis of functional iron deficiency. *Clin Chem* 2002; 48:1066-76.
104. Macdougall IC. Monitoring of iron status and iron supplementation in patients treated with erythropoietin. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1994; 3:620-25.
105. Macdougall IC. What is the most appropriate strategy to monitor functional iron deficiency in the dialysed patient on rhEPO therapy? Merits of percentage hypochromic red cells as a marker of functionally iron deficiency. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13:847-9.
106. Schaefer RM, Schaefer L. Iron monitoring and supplementation: how do we achieve the best result? *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13:9-12.
107. Braun J, Lindner K, Schreiber M, et al. Percentage of hypochromic red blood cells as predictor of erythropoietic and iron response after i.v. iron supplementation in maintenance haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12:1173-81.
108. National Kidney Foundation. Kidney Disease Outcomes Quality Initiative: clinical practice guidelines for anemia of chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19(suppl 2):39-41.
109. Macdougall IC. Meeting the challenges of a new millennium: optimising the use of recombinant human erythropoietin. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13:23-7.
110. Horl WH. What is the most appropriate strategy to monitor functional iron deficiency in the dialysed patient on rhEPO therapy? Measurements of hypochromic red blood cells is not the first line to identify the patient with iron deficiency. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13:850-1.
111. Paterakis GS, Laoutaris NP, Alexia SV, et al. The effect of red cell shape on the measurement of red cell volume: a proposed method for the comparative assessment of this effect among various haematological analysers. *Clin Lab Haematol* 1994; 16:235-245.
112. Hamstra RD, Block MH. Erythropoiesis in response to blood loss in man. *J Appl Physiol* 1969; 27:503-7.
113. Major A, Bauer C, Breymann C, et al. Rh-erythropoietin stimulate immature reticulocyte release in man. *Br J Haematol* 1994; 87:605-8.
114. Cazzola M, Ponchio L, Pedrotti C, et al. Prediction of response to recombinant human erythropoietin (rHuEpo) in anemia of malignancy. *Haematologica* 1996; 81:434-41.
115. Buttarello M, Bulian P, Venudo A, et al. Laboratory evaluation of the Miles H*3 automated reticulocyte counter; a comparative study with manual reference method and Sysmex R-1000. *Arch Pathol Lab Med* 1995; 119:1141-8.
116. D'Onofrio G, Chirillo R, Zini G, et al. Simultaneous measurement of reticulocyte and red blood cell indices in healthy subjects and patients with microcytic and macrocytic anemia. *Blood* 1995; 85:818-23.
117. Davis BH, Bigelow NC, Koepke JA, et al. Flow cytometric reticulocyte analysis. Multiinstitutional interlaboratory correlation study. *Am J Clin Pathol* 1994; 102: 468-77.
118. Davis BH. Report on the ISLH-sponsored immature reticulocyte fraction (IRF) workshop. *Lab Hematol* 1997; 3:261-3.
119. Brugnara C. Use of reticulocyte cellular indices in the diagnosis and treatment of hematological disorders. *Int J Clin Lab Res* 1998; 28:1-11.
120. Brugnara C, Zelmanovic D, Sorette M, et al. Reticulocyte hemoglobin: an integrated parameter for evaluation of erythropoietic activity. *Am J Clin Pathol* 1997; 108: 133-42.
121. Cullen P, Soffker J, Hopfl M, et al. Hypochromic red cells and reticulocyte haemoglobin content as markers of iron-deficient erythropoiesis in patients undergoing chronic haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 659-65.

122. Brugnara C, Laufer MR, Friedman AJ, et al. Reticulocyte hemoglobin content (CHr): early indicator of iron deficiency and response to therapy. *Blood* 1994; 83: 3100-1.
123. Fishbane S, Shapiro W, Dutka P, et al. A randomized trial of iron deficiency testing strategies in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2001; 60:2406-11.
124. Chuang CL, Liu RS, Wei YH, et al. Early prediction of response to intravenous iron supplementation by reticulocyte haemoglobin content and high-fluorescence reticulocyte count in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18:370-7.
125. Guyatt GH, Patterson C, Ali M, Singer J, Levine M, Turpie I, et al. Diagnosis of iron deficiency anemia in the elderly. *Am J Med* 1990; 88:205-9.
126. Guyatt GH, Oxman AD, Willan A, McIlroy W, Patterson C. Laboratory diagnosis of iron deficiency anemia: an overview. *J Gen Intern Med* 1992; 7:145-53.