

Anemie facili e difficili

UGO RAMENGGI

Divisione di Ematologia, Dipartimento di Scienze Pediatriche, Università di Torino

Una breve sintesi, molto aggiornata e ragionata, con semplici algoritmi diagnostici, buoni per tutti i livelli.

Per anemia intendiamo un valore di emoglobina (Hb) più basso di due deviazioni standard rispetto ai valori medi per l'età. Il livello di Hb nell'età pediatrica è inferiore a quello dell'adulto, fatta eccezione per le prime settimane di vita, in cui risente della policitemia neonatale. Con una certa approssimazione possiamo dire che è ancora "nei limiti di normalità" un lattante che abbia più di 9,5 g Hb/dl, o un bambino in età prescolare con oltre 10,5 g/dl.

Stabilito che ci troviamo di fronte a un'anemia, il primo parametro da analizzare per giungere alla diagnosi patogenetica è il volume eritrocitario (volume corpuscolare medio o MCV). In base al volume possiamo distinguere le anemie in microcitiche, normocitiche e macrocitiche.

Nella *Tabella I* sono riportati i valori medi e il limite inferiore dell'Hb e dell'MCV nell'età pediatrica^{1,3}.

ANEMIE MICROCITICHE

La microcitosi si determina per un'alterata maturazione dell'eritroblasto. In condizioni di carenza di una delle tre componenti che costituiscono l'Hb (ferro, catene globiniche o eme), gli eritroblasti, che nel midollo sono in continua proliferazione, ritardano l'inizio del processo di maturazione che li conduce all'espulsione del nucleo e proseguono nel ciclo mitotico. Se l'eritroblasto si divide un numero mag-

DISSECTING CHILDHOOD ANEMIAS

(*Medico e Bambino* 2007;26:27-31)

Key words

Anemia, Hemoglobin, Reticulocyte

Summary

Most forms of anemias in childhood are easy to diagnose. A decreased mean corpuscular volume (MCV) is due to reduced hemoglobin synthesis and suggests iron deficiency or thalassemia. Anemia with a normal MCV is mainly due to hemolysis or hemorrhage. In each case the clinical presentation and/or the patient history is indicative of diagnosis. Normal or high MCV with low levels of reticulocytes are found in hyporegenerative anemias (congenital or acquired) and in several chronic disorders, such as rheumatoid arthritis, renal failure and cancer. Macrocytosis is relevant in children feeded with vegan diet or treated with anti-folate drugs or affected by hypothyroidism. The aim of this article is to help the pediatrician with the diagnosis of the different forms of childhood anemias, with a focus on their pathogenesis.

giore di volte (1-2 divisioni mitotiche in più), dà origine a un numero elevato di globuli rossi di piccolo diametro. Poiché il meccanismo che conduce a microcitosi è legato a una ridotta sintesi di Hb, le anemie microcitiche sono sempre ipocromiche; hanno, cioè, una riduzione dell'Hb in ogni singolo globulo rosso (il valore di MCH o contenuto emoglobinico medio è ridotto).

La maggior parte delle anemie dell'età pediatrica è costituita da anemie microcitiche, la cui patogenesi va ricondotta a soli tre meccanismi: una carenza marziale (il ferro è insufficiente o non è disponibile per la cellula), una sintesi ridotta di catene emoglobiniche (sindromi talassemiche) o un'alterata sintesi dell'eme. L'unica eccezione a questa regola è rappresentata dalla sferocitosi, quadro clinico che si presenta talvolta con un MCV ridotto.

Lo sferocita è infatti un globulo rosso "piccolo", ma deriva da un globulo rosso in origine perfettamente normale che, in seguito alla perdita di tratti della membrana cellulare, per mantenere l'integrità cellulare, è costretto ad abbandonare la forma biconcava e diventa sferico e di diametro più piccolo.

Il valore di MCV che viene riportato sull'esame emocromocitometrico è la media dei volumi dei globuli rossi riscontrati nel campione esaminato; generalmente la sferocitosi ereditaria si presenta come anemia normocitica, a meno che vi sia un numero elevatissimo di sferociti: in questo caso il valore di MCV si riduce significativamente. Ciò che permetterà la diagnosi in questo caso sarà il valore di MCH che risulterà elevato, al contrario di quanto accade in tutte le altre anemie microcitiche.

Nella *Tabella II* sono riassunte le principali cause di anemia microcitica.

Problemi correnti

VALORE MEDIO E MINIMO DI Hb E DI MCV NELL'ETÀ PEDIATRICA

Età	Hb (g/dl)	Hb (g/dl)	MCV (fl)	MCV (fl)
	Valore medio	Valore minimo	Valore medio	Valore minimo
1-6 mesi	11,5	9-9,5	91-94	74
6 mesi - 2 aa	12	10,5	78	70
2 aa - 5 aa	12,5	11,5	80	74
6 aa - 12 aa	13,5	11,5	86	76

*Dati ottenuti dall'analisi di più fonti (referenze 1-3)

Tabella I

CAUSE DI ANEMIA MICROCITICA

A. Carenza di ferro

- Scarso apporto:
 - prematurità, gemellarità*
 - allattamento prolungato*
 - dieta priva di carne*
- Malassorbimento:
 - celiachia*
- Perdita:
 - sanguinamento intestinale*
- Impossibilità all'utilizzo del ferro:
 - atransferrinemia*
 - anemia sideroblastica*
 - emosiderosi polmonare*

B. Ridotta sintesi delle catene globiniche

- β -talassemia
- α -talassemia
- δ -talassemia
- Hb Lepore (anche HbE o HbC
in eterozigosi con emoglobinopatie)

C. Ridotta sintesi dell'eme

- Intossicazione da piombo
- Deficit di rame
- Farmaci antagonisti della B6
- Malattie metaboliche

Tabella II

Le anemie sideropeniche e la saturazione della transferrina

Nella maggior parte dei casi si tratta di forme dovute a carenza di ferro, di diagnosi relativamente facile. Per quanto riguarda la causa, sono in aumento i casi dovuti ad allattamento prolungato. Generalmente l'anemia sideropenica nel lattante si osserva dopo i sei mesi di vita, ma può comparire prima se vi sono scarse riserve neonatali (prematurità, gemellarità) o se vi è stata una concomitante perdita (intolleranza alle proteine del latte, interventi chirurgici). Ricordiamoci che un neonato "normale" ha riserve di ferro solo sino al raddoppio del peso; se la dinamica di incremento ponderale è accelerata, facilmente il lattante andrà incontro a carenza. Poiché la carenza di ferro incide sullo sviluppo cerebrale in maniera indipendente dall'anemia, si ritiene indicato un trattamento profilattico in tutti i neonati prematuri o di basso peso (2 mg/kg/die dal 3° mese o dal raddoppio del peso).

Sono numerose anche le anemie si-

deropeniche in corso di celiachia, di cui talvolta sono l'unico sintomo. È opportuna l'esecuzione di test specifici (anticorpi anti-transglutaminasi) in tutte le anemie sideropeniche dopo i due anni di età. Rispetto all'adulto sono invece meno frequenti le anemie da perdita a livello gastrointestinale.

Come abbiamo detto, vi sono alcune malattie in cui la carenza marziale è solo funzionale: il ferro è presente, ma non può essere utilizzato. Questa condizione si realizza nei deficit di trasporto come nelle ipo- o atransferrinemie o nelle anemie sideroblastiche in cui il ferro si accumula alla periferia degli eritroblasti e anche nelle malattie infiammatorie croniche. Il ferro può

anche essere sequestrato in alcuni tessuti, come avviene nell'emosiderosi polmonare. Tutte queste anemie sono di diagnosi difficile, ma di raro riscontro. Sono caratterizzate da un'elevata saturazione della transferrina (a parte l'emosiderosi polmonare in cui i valori di saturazione variano a seconda dello stadio di malattia). Anche una discreta parte dei casi di anemia da malattia infiammatoria cronica, in particolare quelle che accompagnano di regola l'artrite reumatoide sistemica, è caratterizzata da microcitosi e rientra tra le forme da difetto della utilizzazione del ferro (che viene fissato nel reticolo endoteliale e trova difficoltà al trasporto per l'ipoferritinemia).

La valutazione della saturazione della transferrina è l'esame più utile e meno costoso per valutare il bilancio del ferro. Oggi non ha giustificazione richiedere il dosaggio della ferritina nel sospetto di carenza marziale: sono infatti più informativi i dati forniti dal coefficiente di saturazione della transferrina. Un milligrammo di transferrina è in grado di legare 1,25 microgrammi di ferro; il valore di saturazione viene calcolato dividendo il valore della sideremia per il livello di transferrina moltiplicato per 1,25 (la capacità legante). La Tabella III riporta la formula per il calcolo. Sono normali valori dal 15% al 45%. Si ha sicura carenza di ferro se la saturazione è inferiore al 10%, mentre è patologica una saturazione che supera il 50%.

Le talassemie

La seconda importante causa di anemia microcitica in Italia è rappresentata dalle sindromi talassemiche, patologie in cui vi è un difetto quantitativo nella sintesi delle catene globiniche. Si tratta di ridotta produzione di alfa, beta, delta-catene, oppure di emoglobina Lepore (una catena ottenuta da una parziale fusione dei geni delta e beta). È

FORMULA PER IL CALCOLO DELLA PERCENTUALE DI SATURAZIONE DELLA TRANSFERRINA

$$\frac{\text{VALORE DI TRANSFERRINA} \times 1,25}{\text{VALORE DI SIDEREMIA}} \quad \%$$

Tabella III

importante ricordare che la microcitosi dipende da un difetto quantitativo della sintesi; pertanto non è presente nelle emoglobinopatie dovute a un'alterazione qualitativa nella catena della globina come la drepanocitosi, l'emoglobina C e l'emoglobina E (di provenienza asiatica). Queste ultime causano anemia solo allo stato omozigote o in eterozigosi composta con altre emoglobinopatie (la E determina anche riduzione quantitativa con microcitosi).

I difetti di sintesi dell'eme: malattie rare

La terza e ultima causa di anemia microcitica è rappresentata dai difetti di sintesi dell'eme: si tratta di malattie rare. Riconoscono questo meccanismo patogenetico l'intossicazione da piombo, il deficit di rame, il deficit di piridossina (per lo più dovuto a farmaci antagonisti della vitamina B6).

Come si è detto, la quasi totalità delle anemie microcittiche deriva da un deficit di ferro o da una emoglobinopatia, diagnosi facili da confermare. È invece molto complesso identificare la patogenesi delle anemie microcittiche che si presentano nei primi mesi di vita, qualora venga esclusa una emoglobinopatia. Si tratta generalmente di malattie metaboliche in cui il difetto viene a interferire con il trasporto del ferro o con la sintesi dell'eme. Sono anemie da inviare a un centro specialistico.

ANEMIE NORMO O MACROCITICHE

Le anemie da emorragia

Una anemia normocitica acuta è frequentemente secondaria a emorragia; è una diagnosi relativamente facile perché vi è il dato clinico o anamnestico di sanguinamento. Si tratta per lo più di ematemesi o melena, anche se epistassi abbondanti possono condurre ad anemia. Sono anemie normocittiche perché, almeno inizialmente, il volume eritrocitario risulta essere quello che il paziente aveva prima di sanguinare (l'MCV risulta ridotto se il paziente è un soggetto con microcitosi, portatore sano di anemia mediterranea, per esempio). Superate le prime 24 ore dal sanguinamento, si può osservare macrocitosi, dovuta alla presenza in cir-

colo di un numero molto elevato di reticolociti, che sono di dimensioni maggiori; col passare dei giorni l'MCV tende nuovamente a ridursi per carenza di ferro, anche se la spiccata microcitosi successiva a sanguinamento è appannaggio delle perdite croniche (sanguinamento intestinale o metrorragie).

Le iperemolisi

Se viene escluso un sanguinamento, occorre valutare se vi sono segni di emolisi, quali ittero, talora visibile solo a livello delle sclere, urine ipercromiche e, tra i parametri sierologici, incremento della lattico-deidrogenasi.

La causa più probabile di emolisi acuta è un deficit di glucosio-6-fosfato-deidrogenasi (G6PD), dovuto per lo più ad assunzione di fave, talora ingerite inavvertitamente perché presenti in prodotti costituiti da ortaggi misti. Nei maschi con deficit di G6PD si osservano gravi crisi emolitiche in corso di febbre elevata. Si ritiene che il danno ossidativo della membrana dipenda dall'attivazione dei polimorfociti neutrofili che producono radicali dell'ossigeno come meccanismo di "killing" dei batteri. Tutti gli altri deficit enzimatici sono di raro riscontro e determinano emolisi cronica, che si manifesta già nei primi mesi di vita: tra questi vi sono i deficit di piruvato-chinasi (PK), di pirimidin-5-nucleotidasi (P5N).

Un'emolisi importante, anche questa spesso presente nei primi mesi di vita, è quella da danno meccanico (vizi valvolari cardiaci, protesi, microangiopatia). Orientano nella diagnosi il riscontro di emazie frammentate sullo striscio di sangue (schistociti) e la riduzione dei valori di piastrine, che risentono del trauma fisico quanto i globuli rossi. Grave emolisi si può anche osservare in tutta l'età pediatrica su base autoimmune: una valutazione del test di Coombs deve essere sempre effettuata in caso di emolisi, e risulta in questi casi sempre positiva. Per i pazienti più grandi giova ricordare che la malattia di Wilson può esordire con una crisi emolitica acuta con Coombs negativo⁴.

L'anemia emolitica cronica per eccellenza è invece la sferocitosi ereditaria, caratterizzata da una vita media del globulo rosso costantemente ridotta.

La prima manifestazione della malattia è un ittero neonatale; le forme più gravi richiedono trasfusioni nei primi mesi di vita, le altre vengono diagnosticate successivamente, per lo più in seguito all'accentuazione dell'emolisi nel corso di un'infezione. Nella maggior parte dei casi è trasmessa con meccanismo dominante, per cui la malattia dovrebbe essere rilevabile in uno dei genitori. Emolisi cronica è presente in tutte le patologie della membrana eritrocitaria: nella ellissocitosi (anche se sovente il riscontro di ellissociti è occasionale nell'analisi morfologica di un soggetto "normale"), nella piroipoichilocitosi e nella acantocitosi (sia nella forma classica dovuta ad abetalipoproteinemia che nelle varianti).

Se viene escluso un sanguinamento e non vi sono segni di emolisi, l'iter diagnostico procede con la valutazione dei reticolociti, le cui caratteristiche e i valori normali verranno discussi successivamente.

Le anemie da ridotta eritropoiesi

Se la reticolocitopenia è marcata, ci si trova di fronte a un'aplasia eritroide. Nel primo anno di vita potrà trattarsi di un'anemia di Blackfan-Diamond o di una eritroblastopenia transitoria dell'infanzia (TEC per gli Autori anglosassoni)⁵. Altre forme congenite presentano riduzione di leucociti e/o di piastrine e non solo anemia, e hanno esordio più tardivo (anemia di Fanconi, discheratosi congenita). L'aplasia eritroide acquisita (PRCA, *pure red cell aplasia*, per gli Autori anglosassoni) può comparire nel corso di tutta l'età pediatrica, ed è quasi sempre successiva a un'infezione virale. È classica quella causata da Parvovirus B19, ma anche altri virus possono determinare danno all'eritropoiesi (CMV, EBV).

Per capire come si determina la macrocitosi dobbiamo ricordare il processo di maturazione degli eritroblasti: queste cellule smettono di proliferare e iniziano il processo di maturazione non appena raggiungono una concentrazione "ottimale" di Hb al loro interno. L'ipossia dell'anemia determina un'elevata produzione di eritropoietina che stimola la sintesi di Hb. Se parallelamente il ciclo cellulare è rallentato (presenza di

Problemi correnti

fattori inibenti la proliferazione, difetti di sintesi del DNA), l'eritroblasto raggiunge precocemente la concentrazione critica di Hb e inizia il processo di maturazione "rinunciando" a una ulteriore divisione mitotica. Ciò conduce ad avere nel midollo e poi in circolo meno cellule di maggiori dimensioni.

Si osservano macrocitosi e un valore di reticolociti ridotto o comunque non proporzionato al grado di anemia nelle seguenti condizioni:

□ **Deficit di folati o B12:** entrambe le vitamine sono indispensabili alla sintesi di DNA; in condizioni di carenza il ciclo cellulare procede più lentamente e l'eritroblasto inizia prima il suo programma di maturazione. Il rallentamento del ciclo cellulare coinvolge anche le altre serie e nel midollo, oltre a eritroblasti di grandi dimensioni, sono visibili grandi neutrofilii ipersegmentati. Il deficit di folati è generalmente dovuto all'assunzione di farmaci antifolici, mentre il deficit di B12 può dipendere da mancata introduzione (dieta vegan), alterato assorbimento o difetto di trasporto intracellulare. Queste ultime forme sono rare, ma possono causare danni irreversibili, se non diagnosticate. È importante ricordare che il deficit può essere escluso dal riscontro di valori normali di **omocisteina**. Nei difetti

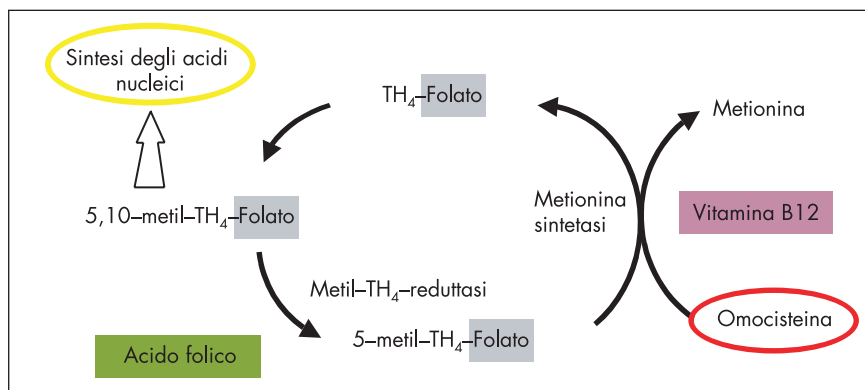


Figura 1. Ciclo dell'acido folico.

ti di trasporto il livello di folati e B12 nel siero risulta quasi sempre normale, e l'elevato livello di omocisteina documenta il difetto funzionale. Se vi è carenza di B12 all'interno della cellula, infatti, il ciclo dell'acido folico è gravemente rallentato nel passaggio da metiltetraidrofolato a tetraidrofolato, dove la B12 funge da cofattore e l'omocisteina da accettore del metile. In carenza di B12 l'omocisteina non si trasforma in metionina e si accumula (Figura 1).

□ **Ipotiroidismo:** l'anemia che si osserva in corso di ipotiroidismo è una classica anemia iporigenerativa: bassi reticolociti e lieve macrocitosi. Alla sua patogenesi concorrono più fattori: riduzione del consumo di ossigeno che

causa ridotta produzione di EPO, e minore azione diretta di stimolo sulla proliferazione cellulare.

□ **Anemie nelle malattie croniche:** ancora più complessa la patogenesi dell'anemia iporigenerativa che si osserva nelle malattie croniche. Ad essa concorrono numerosi fattori: vi è spesso deficit di eritropoietina da danno renale; in alcune malattie autoimmuni come l'artrite reumatoide e il lupus si ha produzione di citochine "pro-infiammatorie" quali il TNF e l'interferon-gamma, che espletano azione inibente sulle cellule staminali. L'attivazione macrofagica inoltre determina un deficit di utilizzo del ferro (in questo caso, relativamente comune, l'anemia è però microcitica, con sidere-

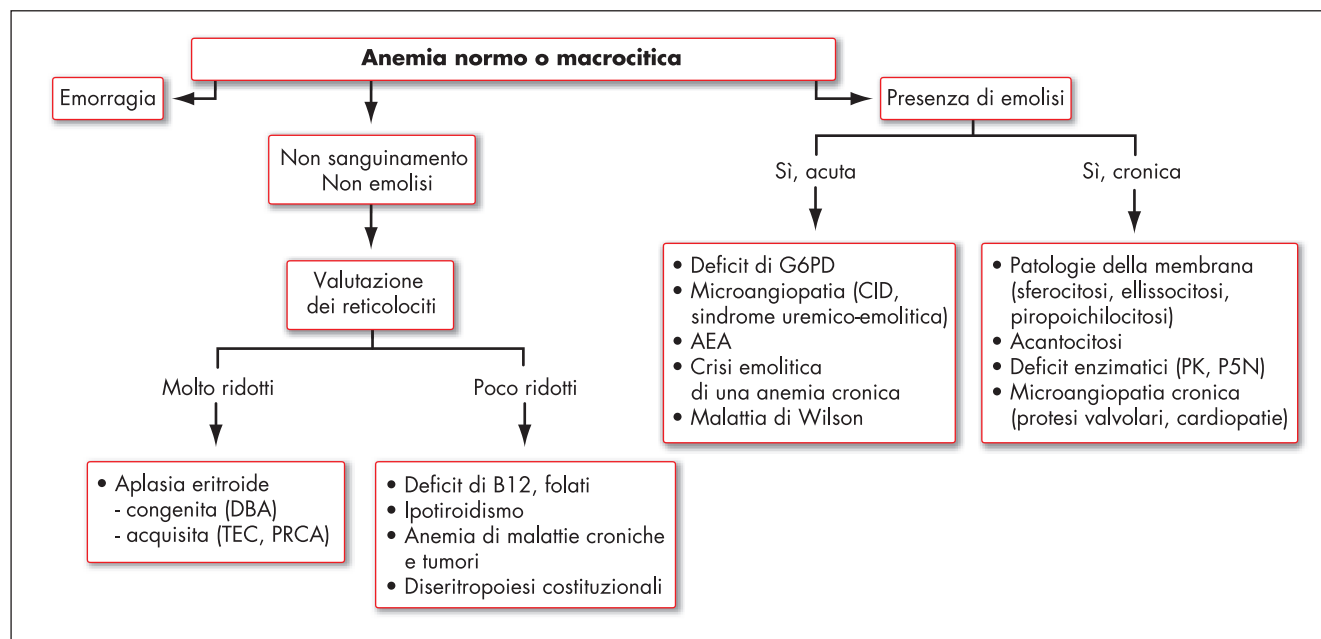


Figura 2. Algoritmo diagnostico nelle anemie normo o macrocitarie.

MESSAGGI CHIAVE

□ La diagnosi di natura delle anemie è per sua natura semplice, basata essenzialmente sulle dimensioni dell'emazia: anemia microcitica, normocitica, macrocitica.

□ L'anemia microcitica (ipocromica, e con basso MCV) è l'espressione di un ritardo di maturazione dell'eritroblasto, cui si accompagna una proliferazione eccessivamente protratta; la causa risiede in un ostacolo alla sintesi di emoglobina. Può essere dovuta a mancata disponibilità di ferro (da scarso apporto, da perdite ematiche croniche o pregresse, da difetto dell'assorbimento, da difficoltà di trasporto o di utilizzo, come può accadere nelle malattie infiammatorie croniche), a errore nella sintesi delle catene globiniche (talassemie), a cause (rare) di ridotta sintesi dell'eme (saturnismo, deficit di rame, malattie metaboliche, antagonisti della vitamina B6).

□ Il test più utile ed economico per la diagnosi di natura delle anemie microcitiche è costituito dalla saturazione della transferrina: bassa nelle anemie carenziali o da perdite, alta nelle anemie da difettoso utilizzo.

□ L'anemia normocitica è una anemia da perdite recenti, oppure una anemia emolitica, o ancora una anemia da difetto di produzione eritroblastica. La sfereocitosi, la malattia emolitica più comune, può, se la frammentazione eritrocitaria è molto intensa, avere un basso MCV, ma ha sempre un elevato MCH.

□ Il test di prima battuta più utile ed economico per una diagnosi di natura delle anemie normocromiche è rappresentato dalla conta dei reticulociti.

□ L'anemia macrocitica (rara) è dovuta a una precoce maturazione dell'eritroblasto, a spese della proliferazione precocemente arrestata. Le cause sono: il deficit di assunzione, assorbimento, trasporto, utilizzo di folati; l'ipotiroidismo, i disturbi primitivi della maturazione dell'eritroblasto (diseritropoiesi), il difetto di eritropoietina (insufficienza renale), e alcune altre malattie croniche.

□ Il dosaggio dei reticulociti, il dosaggio della B12, il dosaggio dell'omocisteina e l'esame del midollo costituiscono gli esami di prima battuta nella diagnosi di natura delle anemie macrocitiche.

mia bassa e saturazione della transferrina alta). La sofferenza epatica conduce a una alterata sintesi proteica e a una alterazione del metabolismo lipidico con danno della membrana eritrocitaria.

□ *Diseritropoiesi costituzionali*: si tratta di rare condizioni genetiche, caratterizzate da bassa reticulocitosi, livello di aptoglobina e alterazioni morfologiche tipiche degli eritroblasti midollari, polinucleati.

La *Figura 2* riporta un algoritmo diagnostico per le anemie normo e macrocitiche.

I RETICOLOCITI

Il conteggio degli eritrociti immaturi, o reticulociti, nel sangue periferico è uno degli esami di maggiore utilità per classificare un'anemia. Purtroppo è un esame poco richiesto, anche se non necessita di un prelievo ulteriore e non ha un costo elevato. Un tempo veniva eseguito attraverso l'esame morfologico con l'impiego di coloranti sopravitali, che colorano l'RNA citoplasmatico formando un reticolo, da cui il nome di reticulociti. Oggi i moderni contatori automatici possono rapidamente valutare la fluorescenza che si è legata agli acidi nucleici. La valutazione è precisa, riproducibile e numerosi i parametri forniti. Innanzitutto è importante il numero: siamo soliti pensare che sia normale un valore di 0,5-1,5% dei GR. Questo è vero solo se il soggetto non è anemico: quando l'Hb scende, lo stimolo sull'eritropoiesi porta a un aumento dei reticulociti, mentre parallelamente si riduce il numero di GR. È quindi più corretto fare sempre riferimento a un numero assoluto: possiamo considerare normali valori di reticulociti tra 35 e 60.000/ml. Nelle anemie emolitiche croniche è facile osservare valori superiori ai 200.000/ml.

I reticulociti hanno un diametro medio del 20% superiore ai corrispondenti globuli rossi maturi; quando il loro numero nel circolo aumenta significativamente, viene modificato il valore di MCV; per questo motivo possiamo riscontrare macrocitosi nelle anemie emolitiche e dopo un'emorragia.

C'è un parametro fornito dall'analisi

dei reticulociti che è di estrema utilità: il contenuto emoglobinico reticulocitario (CHR), che è l'equivalente dell'MCH per i GR. Rispetto a quest'ultimo, rispecchia più fedelmente ciò che sta accadendo all'interno del midollo.

Il CHR è molto basso se vi è difficoltà nella produzione di emoglobina: è il parametro ritenuto attualmente più sensibile per evidenziare una carenza marziale⁶. Parallelamente è anche il primo parametro che si modifica nel corso della correzione di un'anemia. Se dobbiamo verificare l'esistenza di una risposta alla somministrazione di EPO o capire se il soggetto sideropenico stia assorbendo il ferro somministrato per os, è sufficiente valutare se compare un incremento dei valori di CHR, parametro verificabile già dopo 2-3 giorni dall'inizio della terapia.

Questa non è una trattazione esaustiva sulle anemie, per la quale si rinvia a testi specialistici, ma solo una serie di osservazioni volte a dimostrare che, ragionando sui parametri dell'esame emocromocitometrico e avendo presente il meccanismo che determina il volume dei GR, non è difficile formulare una diagnosi corretta nella maggior parte delle anemie che incontriamo nella nostra vita professionale.

Indirizzo per corrispondenza:

Ugo Ramenghi

e-mail: ugo.ramenghi@unito.it

Bibliografia

1. Nathan DG, Orkin SH, Ginsburg D, Look AT. Hematology of infancy and childhood, 6th ed. Philadelphia: WB Saunders, 2003.
2. Lichtman MA, Beutler E, Kaushansky K, Kipps TJ. Williams Hematology. 7th ed. Milano: McGraw Hill, 2005.
3. Madon E, Gabutti V, Miniero R. Ematologia e Oncoematologia Pediatrica. Milano: McGraw-Hill, 1998.
4. Maggiore G. La malattia di Wilson: una diagnosi da non sbagliare. Medico e Bambino 1995;14(4):180-6.
5. Campagnoli MF, Garelli E, Quarello P, et al. Molecular basis of Diamond-Blackfan anemia: new findings from the Italian registry and a review of the literature. Haematologica 2004; 89:480-9.
6. Ullrich C, Wu A, Armsby C, et al. Screening healthy infants for iron deficiency using reticulocyte haemoglobin content. JAMA 2005; 294:924-30.