



El conteo automático de reticulocitos: una herramienta de uso diagnóstico, clínico e investigativo

 18 min.



El proceso de automatización de los últimos tiempos se manifiesta en todas las líneas diagnósticas e investigativas del laboratorio hematológico. El desarrollo de métodos de detección basados en principios ópticos e inmunológicos como la citometría de flujo, constituye la base del proceso de recuento y caracterización de las líneas celulares hemáticas que tiene lugar en los modernos autoanalizadores hematológicos. Hoy, en virtud de los más recientes avances tecnológicos, los autoanalizadores o contadores celulares de últimas generaciones ofrecen el conteo global y varios parámetros reticulocitarios como parte del hemograma automatizado. En el siguiente trabajo nos muestran la importancia del recuento automatizado de reticulocitos por su gran potencial como herramienta en la clasificación, diagnóstico y tratamiento de las anemias. Además permite a los médicos acceder a un diagnóstico o pronóstico más rápido y conocer en el menor tiempo posible, si la terapia instaurada resulta efectiva.



Lic. Laser H. Hernández Reyes¹, Ing. Teresa A. Fundora Sarraff¹, Lic. Mabel Andrade Ruiseco²

¹ Instituto de Hematología e Inmunología, La Habana, Cuba.

² Hospital Pediátrico Universitario "William Soler", La Habana, Cuba.

Revista Cubana de Hematol, Inmunol y Hemoter. 2015;31(4):362-371

Recibido: marzo 23, 2015.

Aceptado: junio 01, 2015.

Lic. *Láser Hernández Reyes*. Instituto de Hematología e Inmunología., La Habana, CUBA.

E-mail: rchematologia@infomed.sld.cu



RESUMEN

Se revisan los antecedentes históricos del conteo de reticulocitos como determinación indispensable en el laboratorio de hematología para la evaluación de la actividad eritropoyética durante la clasificación, diagnóstico y monitoreo de la respuesta terapéutica en distintos trastornos y situaciones clínicas, principalmente en casos de anemias. Se describe el tránsito del tradicional método de conteo de reticulocitos manual al método automatizado y la integración de los parámetros reticulocitarios al hemograma automatizado actual; además, se analizan las desventajas del método de recuento manual y las ventajas del método automatizado, así como los principios de detección en que se basa el conteo electrónico de reticulocitos. Con relación a los parámetros reticulocitarios, se describe su medición, cálculo y unidades de medida; también se resalta la importancia de la fracción de reticulocitos inmaduros y del contenido de hemoglobina reticulocitaria como variables de mayor uso clínico e investigativo en la evaluación de la respuesta medular ante diversos trastornos clínicos y protocolos terapéuticos. Por último, se alude a la necesidad del conocimiento y

empleo de las variables reticulocitarias en la práctica clínica de rutina por parte de los clínicos y especialistas en hematología.

Palabras clave: parámetros reticulocitarios, fracción de reticulocitos inmaduros, contenido de hemoglobina reticulocitaria.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el proceso de automatización se manifiesta en todas las líneas diagnósticas e investigativas del laboratorio hematológico. El desarrollo de métodos de detección basados en principios ópticos, de impedancia e inmunológicos como la citometría de flujo, constituye la base del proceso de recuento y caracterización de las líneas celulares hemáticas que tiene lugar en los modernos autoanalizadores hematológicos. (1,2)

El surgimiento y comercialización de toda una generación de complejos hematológicos, ha puesto en mano de médicos y especialistas una citometría hemática mucho más integral, precisa, confiable y cuyos resultados están disponibles en cuestión de segundos, al tiempo que aporta toda una amplia gama de parámetros celulares en aras de contribuir a la mejor orientación diagnóstica, pronóstica y evolutiva de los trastornos hematológicos. (3,4)

El recuento de reticulocitos, como herramienta básica en la evaluación de la respuesta eritropoyética, se ha visto durante décadas como elemento complementario de los resultados del hemograma y hasta

cierto punto, ajeno a este. Hoy, en virtud de los más recientes avances tecnológicos, los autoanalizadores o contadores celulares de últimas generaciones ofrecen el conteo global y varios parámetros reticulocitarios como parte del hemograma automatizado. (3)

CONTEO DE RETICULOCITOS: DEL MÉTODO MANUAL AL AUTOMATIZADO

La primera descripción del método manual para el conteo de reticulocitos fue realizada en 1949. Mucho tiempo antes, en la segunda mitad del siglo XIX, se había descrito la existencia de los reticulocitos y su condición como células rojas jóvenes en la circulación. (5,6)

Los reticulocitos son células rojas en el penúltimo estadio de maduración resultantes del proceso de diferenciación del eritroblasto ortocromático, luego de la eyección del núcleo por este último. Conservan restos de material retículo-filamentoso constituido principalmente por ribonucleoproteínas (ARN y proteínas) presentes en cantidad considerable en las células nucleadas que le preceden. El proceso de maduración a eritrocito ocurre en la médula ósea, durante tres días aproximadamente y durante un día en sangre periférica e implica la eliminación paulatina del material reticular intracitoplasmático. (7)

En 1881, se evidenció la existencia del material reticulofilamentoso en el interior de los reticulocitos por medio de la coloración supravital; y en 1932 se clasificó la población reticulocitaria en cuatro estadios madurativos de acuerdo con su contenido en ribosomas, mitocondrias y ARN residual. (5,6)

Desde finales de la década del 40 del siglo XX hasta los primeros años de los 80, la técnica de recuento manual mediante la precipitación y tinción del material basófilo intrareticulocitario con colorantes supravitales como el azul brillante de cresilo y el nuevo azul de metileno, constituyó el método estándar para el recuento de reticulocitos, que aun se emplea en algunos

laboratorios. (5)

En este procedimiento se mezclan e incuban iguales volúmenes de sangre total, capilar o venosa, y colorante; luego se realiza un extendido de la mezcla y se cuentan los reticulocitos en el microscopio óptico. (8)

Este proceder muestra coeficientes de variación muy elevados, debido a las diferencias significativas que muestran los recuentos que se realizan por distintos observadores e incluso aquellos llevados a cabo por un mismo observador. La variabilidad de resultados obedece, entre otras causas, al conteo de menos de mil células o a su recuento en áreas no adecuadas del frotis, a la confusión de restos de material reticulofilamentoso con cuerpos de Heinz, partículas de colorante precipitadas o inclusiones intraeritrocitarias, y a las variaciones en la coloración. También contribuye lo monótono del procedimiento y el procesamiento de especímenes con pocos reticulocitos. (5,6)

Durante la década de 1980, el desarrollo de las técnicas de citometría de flujo y su aplicación en la detección y caracterización de las subpoblaciones celulares hemáticas elevó los estándares de calidad del conteo de reticulocitos a cifras inimaginables y marcó la ruta a seguir para la futura incorporación de esta medida en los autoanalizadores hematológicos, menos costosos que los citómetros de flujo convencionales. (1,3,6)

El marcaje del ARN reticulocitario residual con una variedad de fluorocromos como el naranja de tiazol, auramina O, polymethine y el CD4K530, así como con colorantes vitales no fluorescentes como el azul de metileno y la oxazina 750, paralelo al desarrollo de novedosos sistemas de detección de señales eléctricas, de absorción y dispersión de luz láser en diversos ángulos y de fluorescencia, hizo posible la automatización a gran escala del conteo reticulocitario con excelentes indicadores de calidad. También el avance de la tecnología informática contribuyó de modo decisivo al logro de tal propósito en su función de control durante el proceso.

(1,3,6,9)

El método de recuento electrónico eliminó el error estadístico y la falta de reproducibilidad inherente al método manual, toda vez que examina miles de células por espécimen en cuestión de segundos. Por otro lado, se procesan un gran número de muestras en pocos minutos, con lo que disminuye en gran medida el tiempo de respuesta al cliente. (6)

En la actualidad, numerosos proveedores exhiben en el mercado mundial autoanalizadores hematológicos que ofrecen el recuento reticulocitario y otros parámetros derivados, como parte integral del hemograma tipo VI, dentro de los que se encuentran los últimos modelos las casas Abbott, Sysmex, Horiba-ABX, Bayer y Beckman-Coulter. (1,7)

PARÁMETROS DEL RECuento AUTOMÁTICO DE RETICULOCITOS. APLICACIÓN CLÍNICA

Los analizadores hematológicos actuales ofrecen los resultados del recuento reticulocitario y una serie de parámetros derivados, además de diagramas de distribución (citogramas e histogramas) que se construyen a partir de la integración y procesamiento electrónico de las señales de fluorescencia, dispersión o absorción de la luz láser que reciben los detectores al pasar las células por la zona censora del dispositivo. (1,6)

Recuento de reticulocitos: se mide de forma directa y su valor se ofrece en cifras absolutas ($/\text{mm}^3$) o en porcentaje (%) con respecto al conteo de eritrocitos.

En casos de anemia, la expresión de los resultados en porcentaje se debe corregir y expresar como recuento de reticulocitos corregido (RRC) o índice reticulocitario (IR). Esto se debe a que el cálculo de dicho valor se refiere a un número normal de hematíes, lo que no se cumple en caso de anemia; para ello se aplica la fórmula: (3,10)



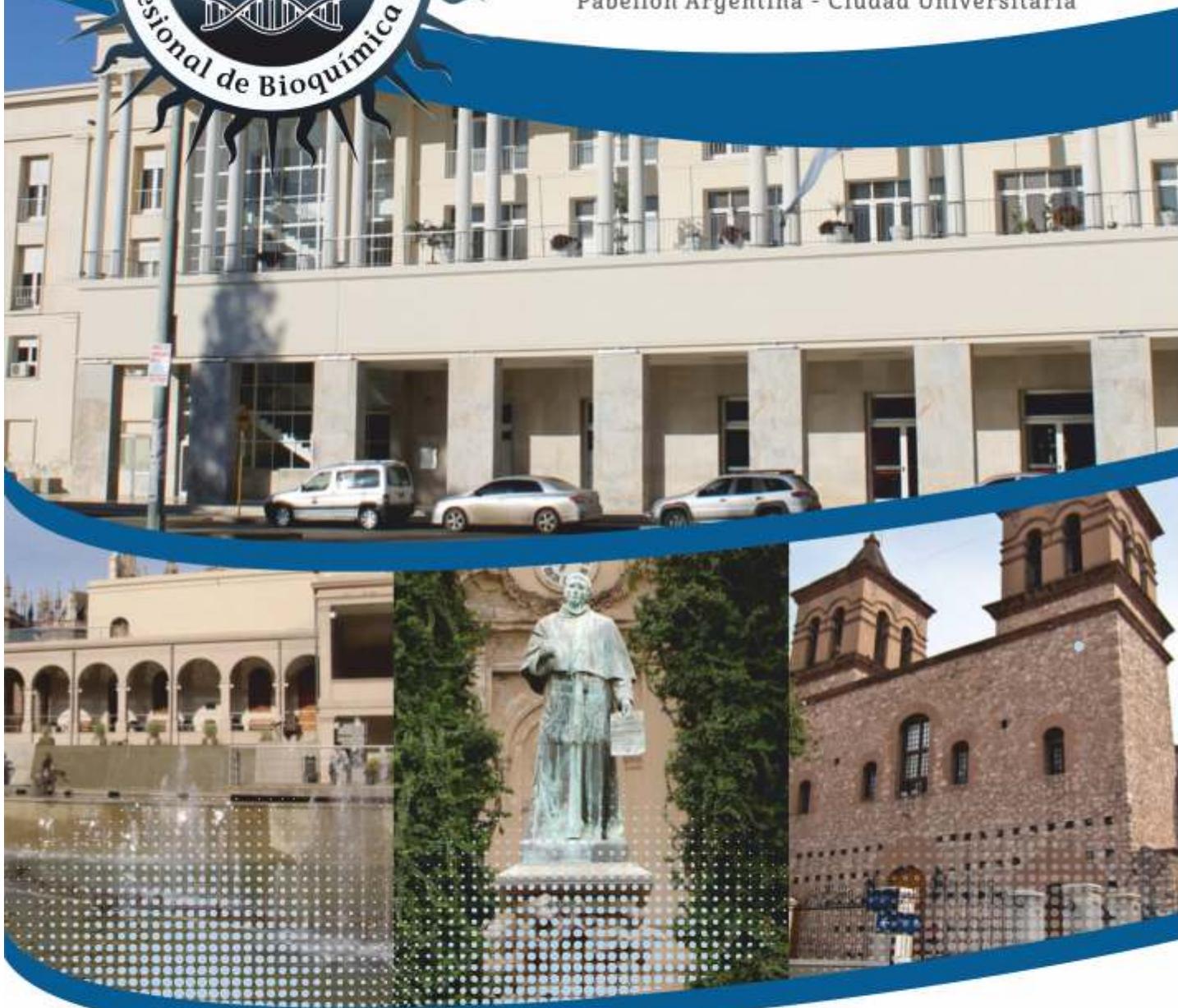
I Congreso Científico Profesional de Bioquímica

“Un punto de Encuentro y Proyección”

5 al 8 de Octubre de 2016

CORDOBA - ARGENTINA

Pabellón Argentina - Ciudad Universitaria



EL I CONGRESO CIENTÍFICO PROFESIONAL DE BIOQUÍMICA 2016 abordará cuatro ejes temáticos: **salud, laboratorio forense y toxicología, tecnología de los alimentos y química del ambiente.**

ORGANIZAN



INFORMES e INSCRIPCIONES
bioquimica@grupobinomio.com.ar
Tel. +54 351 489 1914

www.bioquimica2016.com.ar

$$RRC \text{ o IR} = \frac{\text{Reticulocitos (\%)} \times \text{Hematocrito del paciente (L/L)}}{\text{Hematocrito de referencia (L/L)}}$$

donde Hematocrito de referencia: 0.45

En los casos de anemia intensa la cifra reticulocitaria debe corregirse por el tiempo de vida media en sangre periférica de los reticulocitos que se liberan de modo abortivo por la médula como respuesta compensatoria. Como se sabe, en estas circunstancias existe una relación inversa entre la disminución de la cifra de hematocrito y el aumento del tiempo de vida media de los reticulocitos en circulación, a la vez que se acorta su periodo de maduración intramedular. Esta situación conduce a la sobrestimación de la cifra reticulocitaria por el aumento del tiempo de vida media de estas células en sangre circulante. (10,11)

La corrección de los valores porcentuales de reticulocitos por el incremento de su tiempo de vida media en circulación de acuerdo con el grado de anemia, condiciona el surgimiento del índice de producción reticulocitaria (IPR), cuya fórmula es:

$$IPR = \frac{\text{Reticulocitos (\%)} \times \text{Hematocrito de paciente (L/L)}}{\text{Factor de corrección Hematocrito de referencia (L/L)}}$$

El valor del factor de corrección para el individuo sano es de 1 para la cifra de hematocrito de referencia (0,45 L/L), pero aumenta en 0,5 por cada 10 % de disminución de la cifra de hematocrito. La mayor parte de los autores utilizan 0.45 como valor de hematocrito de referencia en el cálculo del IR y del IPR, aplicable tanto para hombres como para mujeres. (5,10,11) Clínicamente, los valores del IPR se relacionan con el grado de regeneración medular, de manera que valores mayores e iguales a 3 caracterizan a las anemia regenerativas; e inferiores a 2, a las anemias arregenerativas. (5,10)

Desde el punto de vista diagnóstico, la cifra global de reticulocitos se utiliza para evaluar la respuesta eritropoyética a la disminución volumen globular; así como en la clasificación fisiopatológica y funcional de las anemias. También es útil en el monitoreo de la supresión y la recu-

peración medular tras la terapia citotóxica (quimioterapia o radioterapia), en la evaluación de la regeneración medular luego del trasplante de médula ósea o de células troncales y en la validación de la efectividad de diversos tratamientos antianémicos. (6,11,12)

Los valores altos del recuento absoluto de reticulocitos suelen observarse durante las crisis de hemólisis en las anemias hemolíticas congénitas, las anemias hemolíticas inmunológicas y en la infestación por *Plasmodium falciparum*. También se aprecian recuentos elevados en las anemias hemorrágicas agudas; sin embargo, en las anemias hemorrágicas crónicas el conteo absoluto de reticulocitos puede ser normal o bajo en relación con la depleción férrica. (6,12,13)

Por otra parte, niveles bajos del recuento absoluto de reticulocitos se observan comúnmente en las anemias por trastornos en la utilización del hierro (anemia ferripriva, anemia de la enfermedad crónica, sideroblásticas, etc), en los defectos o supresión de la actividad eritropoyética (anemia aplásica, anemia por infiltración medular metastásica, etc) y en aquellas que se producen por anomalías en la síntesis del ADN (anemias megaloblásticas). (6,12)

Fración de reticulocitos inmaduros (FRI): durante el procesamiento automático por el método de citometría de flujo y la utilización de colorantes fluorescentes, la población reticulocitaria sujeta a análisis es dividida en tres fracciones de acuerdo con el grado de absorción de la luz y la intensidad de la fluorescencia en relación con la magnitud de la tinción y su contenido en ácido ribonucleico, lo que define su estado de madurez. Así se obtienen tres subpoblaciones reticulocitarias: la primera, de baja fluorescencia y madurez próxima al hematíe maduro (*LFR*, siglas en inglés); la segunda, de fluorescencia y madurez intermedias (*MFR*); y la tercera, de mayor fluorescencia e inmadurez (*HFR*). Estas subpoblaciones se representan gráficamente en histogramas o citogramas, según el número de células y la magnitud de las señales de dispersión óptica y fluorescencia

registradas de acuerdo con su estado madurativo (figura). La suma de las fracciones de media y alta fluorescencia, que contienen la mayor cantidad de ARN, se corresponde con la FRI que se expresa en porcentaje. (1,5,13)

Durante la regeneración medular, el aumento de la FRI en sangre periférica se produce antes del incremento absoluto del número de reticulocitos, por lo que se considera un marcador precoz de la actividad eritropoyética, muy útil en la práctica clínica. (7)



Las subpoblaciones reticulocitarias se dividen en tres fracciones de acuerdo con la magnitud de la fluorescencia en relación con su grado de madurez: fracción de baja fluorescencia (LFR), de fluorescencia intermedia (MFR) y de alta fluorescencia (HFR). La fracción de reticulocitos inmaduros (FRI) es la suma de las fracciones reticulocitarias de media y alta fluorescencia.

Fig. Diagrama de la relación entre el número total de células rojas y la intensidad de fluorescencia luego de tinción al ADN con fluoresceína. (Tomado y modificado de: Riley S, Jonathan M. K. Retículo y Ensayos de Part 6 Present. Laboratory medicine, 2001).⁶

El aumento de la FRI indica la recuperación medular tras la terapia de inducción en pacientes que sufren procesos hematológicos malignos. La FRI resulta un predictor precoz del prendimiento mieloide luego del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos mucho más sensible que otros parámetros utilizados en la evaluación de la recuperación medular tras esta terapia, como son el conteo absoluto de neutrófilos (CAN), el recuento de plaquetas y el porcentaje de plaquetas reticuladas (PR). El uso clínico de la FRI como marcador de recuperación hematopoyética permite anticipar la toma de decisiones terapéuticas de importancia en torno a estos pacientes a un bajo costo económico y

menor cantidad de molestias. (6,12,14,15)

En la anemia aplásica se reportan valores muy bajos del conteo absoluto de reticulocitos y de la FRI; sin embargo, niveles bajos o normales del conteo absoluto de reticulocitos con resultados variables de la FRI se observan en la leucemia, los síndromes mielodisplásicos, la eritropoyesis ineficaz y las anemias megaloblásticas.

Los valores de la FRI en pacientes con leucemia se deben examinar con cuidado, ya que en esta entidad el aumento de la FRI no siempre obedece al incremento de la actividad eritropoyética. Algunos trabajos reflejan que en pacientes con leucocitosis extrema los valores de la FRI pueden elevarse por la persistencia en las muestras de leucocitos que se tiñen con algunos fluorocromos y exhiben una baja fluorescencia. El citograma de dispersión evidencia dicha anormalidad en la pantalla del equipo a través de persistencia de señales fluorescentes en áreas no correspondientes a la región reticulocitaria. (6,12,16)

La FRI resulta un marcador temprano de la eritropoyesis deficiente en hierro en embarazadas, al aumentar sus valores antes que la disminución del VCM y de la hemoglobina. Además, en respuesta al tratamiento adecuado sus valores aumentan mucho antes que la cifra absoluta de reticulocitos. (5,17)

Valores muy altos de la FRI y de los conteos absolutos de reticulocitos se observan en las anemias hemolíticas congénitas e inmunológicas y en la hemorragia aguda; sin embargo, en la hemorragia crónica se aprecian valores discretamente bajos de la FRI en relación con pérdida de hierro. (6,12,15)

En la insuficiencia renal crónica (IRC) con anemia, tanto el número total de reticulocitos como la FRI disminuyen en relación con la disminución de los niveles plasmáticos de eritropoyetina. La FRI se utiliza en estos pacientes como indicador precoz de la eritropoyesis ferropénica, como herramienta en el seguimiento de la

respuesta medular al tratamiento con eritropoyetina y en la evaluación de la aceptación del trasplante renal. (6,12,18)

Desde el punto de vista terapéutico, los valores de la FRI se utilizan en la evaluación temprana de la efectividad de los tratamientos estimuladores o supresores de la eritropoyesis, dentro de los que destaca la terapia con eritropoyetina humana recombinante (EPO), tanto en niños como en adultos, y el tratamiento de las anemias carenciales con sales de hierro, vitaminas o ambos. También se utiliza en el monitoreo de la regeneración medular tras la terapia de inducción en procesos malignos y en la evaluación de la actividad eritropoyética durante las crisis de hemólisis e hipoxia en el paciente con anemia drepanocítica, así como en el seguimiento de la terapia con hidroxiurea. (3,6,12)

Cabe resaltar el uso de la FRI en el estudio de la hemólisis latente o de bajo grado, en la evaluación de la toxicidad medular por drogas y para definir la necesidad de transfusión en neonatos. (6,12,15)

Desde el punto de vista investigativo, esta variable posee valor en el control del *doping* por eritropoyetina en deportistas de alto rendimiento, en el monitoreo de la movilización de células madre CD34+ a sangre periférica, y en el estudio de la expresión de receptores CD36 en reticulocitos de estrés en la enfermedad de células falciformes y otras anemias hemolíticas crónicas. (6,12,19)

Contenido de Hemoglobina Reticulocitaria (CHR): este parámetro se obtiene como producto del volumen corpuscular medio reticulocitario (VCMr) y la concentración de hemoglobina corpuscular media reticulocitaria (CHbCMr); sus valores se expresan en picogramos (pg).

Resulta un marcador precoz de la eritropoyesis deficiente en hierro, de mayor sensibilidad que las variables clásicas del metabolismo del hierro (determinación de hierro sérico, de capacidad total de fijación de hierro por la transferrina, índice de

saturación de la transferrina, ferritina sérica y el receptor soluble de transferrina); lo que unido a su incorporación como parámetro reticulocitario al hemograma automatizado, adiciona un menor costo y mayor disponibilidad a su determinación. Algunos equipos automáticos ofrecen la hemoglobina reticulocitaria equivalente (RET-He), parámetro que desde el punto de vista clínico posee la misma utilidad que el CHR y se expresa en las mismas unidades. (1,12,15)

Esta variable encuentra sus mayores aplicaciones en la detección de la depleción férrica y en la evaluación de la disponibilidad de hierro funcional, especialmente en niños, en pacientes con fallo renal en régimen de diálisis y tratamiento con eritropoyetina, en la anemia de los procesos crónicos y en el diagnóstico, seguimiento y tratamiento de la anemia ferripriva de forma general. (7,15,20,21)

Como otro parámetro reticulocitario que se mide de forma directa por las últimas tecnologías, se cita el *índice de fluorescencia media* (MFI), que tiene uso como predictor temprano del fallo o del prendimiento mieloide tras el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. (1,15)

CONSIDERACIONES FINALES

A lo largo de la historia, el conteo de reticulocitos se estableció en el laboratorio hematológico como la prueba más sencilla y de mayor disponibilidad para la evaluación de la actividad eritropoyética en distintos trastornos hematológicos, sobre todo en casos de anemia. Sin embargo, esta determinación no se ha visto ajena al desarrollo tecnológico de los últimos años y hoy, gracias a los modernos autoanalizadores hematológicos, se incorpora a los hemogramas automatizados de conjunto con toda una serie de parámetros reticulocitarios.

Quedaron atrás los tiempos en que el método de recuento de reticulocitos manual, con sus grandes inexactitudes e imprecisiones era el único disponible. Hoy, el

recuento automático de reticulocitos no solo se realiza en citómetros de flujo, de modo independiente y a un elevado costo, sino que se lleva a cabo por contadores celulares convencionales capaces de ofrecer un hemograma mucho más integral, de mayor calidad, rapidez, accesibilidad y sobre todo, menor costo.

Desde el punto de vista clínico, el recuento electrónico de reticulocitos con sus parámetros derivados exhibe un mayor potencial como herramienta en la clasificación, diagnóstico y tratamiento de las anemias; en la evaluación de la efectividad de la terapia supresora o estimuladora de la actividad eritropoyética; y en el monitoreo de la respuesta medular en casos de trasplante de médula ósea o progenitores hematopoyéticos. Todo esto permite a los médicos acceder a un diagnóstico o pronóstico más rápido y conocer en el menor tiempo posible, si la terapia instaurada resulta efectiva, lo que se traduce, sin dudas, en una toma de decisiones más oportuna que limita las molestias al paciente, acorta sus estancias y reduce el costo de los servicios.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jou JM. Aplicación diagnóstica de los nuevos parámetros de la serie roja en autoanalizadores hematológicos. *Haematologica* (ed. esp). 2008;93 (Extra 1):410-5.
2. Hernández-Reyes L. Avances y aplicación clínica de la biometría hemática automatizada. *Rev Cubana Hemat Inmunol Hemoter*. 2013 Ene-Mar;29 (1):24-39.
3. Campuzano-Maya G. Del hemograma manual al hemograma de cuarta generación. *Medicina & Laboratorio*. 2007;13:511-50.
4. Hernández-Reyes L. El hemograma: nueva clasificación y perspectivas. *Rev Cubana Hemat Inmunol Hemoter*. 2014 Ene-Mar;30 (1):89-92.
12. Sysmex Xtra Online. Reticulocytes and their significance. August 2010 | pages. Sysmex Europe GmbH. Disponible en: [http://www.sysmex-europe.com/search.html?tx_solr\[q\]=Reticulocytes%20and%20their%20significance](http://www.sysmex-europe.com/search.html?tx_solr[q]=Reticulocytes%20and%20their%20significance) (Citado: agosto 25, 2014)
6. Riley S, Jonathan M. Reticulocyte Enumeration: Past & Present. *Laboratory medicine*. 2001;32 (1):599-608.
7. Alonso M. Índices Reticulocitarios: Fracción inmadura de reticulocitos (FIR), Contenido de Hemoglobina de Reticulocitos (CHR). *Hematología*. 2013 Ene-Mar;17(1):67-9.
8. González D, Rabionet BT. Manual Básico de Hematología. 1ª ed. Stgo de Cuba: Centro Provincial de Información de Ciencias Médicas;2006:67-70.
9. Heikalí D, Di Carlo D. A niche for microfluidics in portable hematology analyzers. *J Assoc Lab Autom*. 2010;15(4):319–28. doi:10.1016/j.jala.2010.02.005
10. Torrent Español M, Badell Serra I. Interpretación del hemograma y de las pruebas de coagulación. 9na ed. Madrid: Exlibris Ediciones;2012.p. 203-16.
11. García-González F. Utilidad de la biometría hemática en la práctica clínica. *Rev Sanid Milit Mex*. 2011 Nov-Dic;65(6):294-300.
12. D'Onofrio G, Zini G. Clinical applications of new reticulocyte parameters. *Haematologica* (ed. esp). 2002;87 (1):134-8.
13. Vásquez AM, Tobón A. Mecanismo de patogenia en la malaria por *Plasmodium falciparum*. *Biomédica*. 2012 ene;32 (1):106-20.
14. Yesmin S, Sultana T, Roy CK, Ahmed A. Immature reticulocyte fraction as a predictor of bone marrow recovery in children with acute lymphoblastic leukaemia on remission induction phase. *Bangladesh Med Res Counc Bull*. 2011;37:57-60.
15. Piva E, Brugnara C, Chiandetti L, Plebani M. Automated reticulocyte counting: state of the art and clinical applications in the evaluation of erythropoiesis. *Clin Chem Lab Med*. 2010;48:1369-80.
16. Huh J, Moon H, Chung W. Erroneously elevated immature reticulocyte counts in leukemic patients determined using a Sysmex XE-2100 hematology analyzer. *Ann Hematol*. 2007;86:759–62.
17. Canalejo K, Aixalá M, Casella A, Capanera P. Evaluación de la fracción de reticulocitos inmaduros

como parámetro de ferropenia en el embarazo. *Acta Bioquím Clín Latinoam*. 2011;45 (1):81-5.

18. Oustamanolakis P, Ioannis E, Ippokratis M. Measurement of reticulocyte and red blood cell indices in the evaluation of anemia in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis*. 2011 Aug;5(4):295-300.
19. Svarch E, Marcheco-Teruel B, Machín-García G, Menéndez-Veitia A. La drepanocitosis en Cuba. Estudio en niños. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*. 2011 Ene-Mar;27 (1):51-67.
20. Eckhardt A, Freiberg Ma, de la Fuente Jbc, Douthat Wbc, Capra Ra. Utilidad Clínica de la Hemoglobina Reticulocitaria Equivalente en Pacientes en Hemodialisis Crónica. *Rev Fac Cienc Med*. 2011;68(2):51-3.
21. Mateos ME, De la Cruz J, López E. Contenido de hemoglobina reticulocitaria para el diagnóstico de la ferropenia. *An Pediatr (Barc)*. 2009 Aug;71(2):103-9. doi:10.1016/j.anpedi.2009.04.006.