

UNIVERSITE D'ANGERS

FACULTE DE MEDECINE

Année 2013

N°.....

THESE

pour le

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Qualification en : BIOLOGIE MEDICALE

Par

Philippe DUBREUIL

Né le 02 décembre 1983 à VANNES (Morbihan)

Présentée et soutenue publiquement le : 21 mars 2013

*INTERET DES ANALYSEURS D'HEMATOLOGIE SYSMEX XE-2100 ET
XE-5000 POUR LE DIAGNOSTIC DU PALUDISME DANS UN PAYS NON
ENDEMIQUE (FRANCE)*

Président : Monsieur le Professeur BOUCHARA Jean-Philippe

Directeur : Monsieur le Professeur ZANDECKI Marc

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné (e) Philippe DUBREUIL....., déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés sur toutes formes de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce rapport ou mémoire.

Signature :



UNIVERSITE D'ANGERS

FACULTE DE MEDECINE

Année 2013

N°.....

THESE

pour le

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Qualification en : BIOLOGIE MEDICALE

Par

Philippe DUBREUIL

Né le 02 décembre 1983 à VANNES (Morbihan)

Présentée et soutenue publiquement le : 21 mars 2013

*INTERET DES ANALYSEURS D'HEMATOLOGIE SYSMEX XE-2100 ET
XE-5000 POUR LE DIAGNOSTIC DU PALUDISME DANS UN PAYS NON
ENDEMIQUE (FRANCE)*

Président : Monsieur le Professeur BOUCHARA Jean-Philippe

Directeur : Monsieur le Professeur ZANDECKI Marc

LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE D'ANGERS

Doyen

Vice doyen recherche

Vice doyen pédagogie

Pr. RICHARD

Pr. BAUFRETON

Pr. COUTANT

Doyens Honoraires : Pr. BIGORGNE, Pr. EMILE, Pr. REBEL, Pr. RENIER, Pr. SAINT-ANDRÉ

Professeur Émérite : Pr. GUY

Professeurs Honoraires : Pr. ACHARD, Pr. ALLAIN, Pr. ALQUIER, Pr. BIGORGNE, Pr. BOASSON, Pr. BREGEON, Pr. CARBONNELLE, Pr. CARON-POITREAU, Pr. M. CAVELLAT, Pr. COUPRIS, Pr. DAUVER, Pr. DELHUMEAU, Pr. DENIS, Pr. EMILE, Pr. FOURNIÉ, Pr. FRANÇOIS, Pr. FRESSINAUD, Pr. GESLIN, Pr. GROSIEUX, Pr. GUY, Pr. HUREZ, Pr. JALLET, Pr. LARGET-PIET, Pr. LARRA, Pr. LIMAL, Pr. MARCAIS, Pr. PENNEAU, Pr. PIDHORZ, Pr. POUPLARD, Pr. REBEL, Pr. RENIER, Pr. RONCERAY, Pr. SIMARD, Pr. SORET, Pr. TADEI, Pr. TRUELLE, Pr. TUCHAIS, Pr. WARTEL

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

MM	ABRAHAM Pierre	Physiologie
	ARNAUD Jean-Pierre	Chirurgie générale
	ASFAR Pierre	Réanimation médicale
	AUBÉ Christophe	Radiologie et imagerie médicale
	AUDRAN Maurice	Rhumatologie
	AZZOUI Abdel-Rahmène	Urologie
Mmes	BARON Céline	Médecine générale (professeur associé)
	BARTHELAIX Annick	Biologie cellulaire
MM	BASLÉ Michel	Cytologie et histologie
	BATAILLE François-Régis	Hématologie ; Transfusion
	BAUFRETON Christophe	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
	BEAUCHET Olivier	Médecine interne, gériatrie et biologie du vieillissement
	BEYDON Laurent	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
	BIZOT Pascal	Chirurgie orthopédique et traumatologique
	BONNEAU Dominique	Génétique
	BOUCHARA Jean-Philippe	Parasitologie et mycologie
	BOYER Jean	Gastroentérologie ; hépatologie
	CALES Paul	Gastroentérologie ; hépatologie
	CAROLI-BOSC François-Xavier	Gastroentérologie ; hépatologie
	CHABASSE Dominique	Parasitologie et mycologie
	CHAPPARD Daniel	Cytologie et histologie
	COUTANT Régis	Pédiatrie
	COUTURIER Olivier	Biophysique et Médecine nucléaire
	DARSONVAL Vincent	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie
	de BRUX Jean-Louis	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
	DESCAMPS Philippe	Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale
	DIQUET Bertrand	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique
	DUBAS Frédéric	Neurologie
	DUBIN Jacques	Oto-rhino-laryngologie
	DUVERGER Philippe	Pédiatrie
	ENON Bernard	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire
	FANELLO Serge	Épidémiologie, économie de la santé et prévention

MM	FOURNIER Henri-Dominique	Anatomie
	FURBER Alain	Cardiologie
	GAGNADOUX Frédéric	Pneumologie
	GARNIER François	Médecine générale (professeur associé)
	GARRÉ Jean-Bernard	Psychiatrie d'adultes
	GINIÈS Jean-Louis	Pédiatrie
	GRANRY Jean-Claude	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
	HAMY Antoine	Chirurgie générale
	HUEZ Jean-François	Médecine générale
Mme	HUNAULT-BERGER Mathilde	Hématologie ; transfusion
M.	IFRAH Norbert	Hématologie ; transfusion
Mmes	JEANNIN Pascale	Immunologie
	JOLY-GUILLOU Marie-Laure	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
MM	LACCOURREYE Laurent	Oto-rhino-laryngologie
	LAUMONIER Frédéric	Chirurgie infantile
	LE JEUNE Jean-Jacques	Biophysique et médecine nucléaire
	LEFTHÉRIOTIS Georges	Physiologie
	LEGRAND Erick	Rhumatologie
	LEROLLE Nicolas	Réanimation médicale
Mme	LUNEL-FABIANI Françoise	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
MM	MALTHIÉRY Yves	Biochimie et biologie moléculaire
	MARTIN Ludovic	Dermato-vénérérologie
	MENEI Philippe	Neurochirurgie
	MERCAT Alain	Réanimation médicale
	MERCIER Philippe	Anatomie
	MILEA Dan	Ophthalmologie
Mme	NGUYEN Sylvie	Pédiatrie
M.	PARÉ François	Médecine générale (professeur associé)
Mme	PENNEAU-FONTBONNE Dominique	Médecine et santé au travail
MM	PICHARD Eric	Maladies infectieuses ; maladies tropicales
	PICQUET Jean	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire
	PODEVIN Guillaume	Chirurgie infantile
	PROCACCIO Vincent	Génétique
	PRUNIER Fabrice	Cardiologie
	RACINEUX Jean-Louis	Pneumologie
	REYNIER Pascal	Biochimie et biologie moléculaire
Mme	RICHARD Isabelle	Médecine physique et de réadaptation
MM	RODIEN Patrice	Endocrinologie et maladies métaboliques
	ROHMER Vincent	Endocrinologie et maladies métaboliques
	ROQUELAURE Yves	Médecine et santé au travail
Mmes	ROUGÉ-MAILLART Clotilde	Médecine légale et droit de la santé
	ROUSSELET Marie-Christine	Anatomie et cytologie pathologiques
MM	ROY Pierre-Marie	Thérapeutique ; médecine d'urgence ; addictologie
	SAINT-ANDRÉ Jean-Paul	Anatomie et cytologie pathologiques
	SENTILHES Loïc	Gynécologie-obstétrique
	SUBRA Jean-François	Néphrologie
	URBAN Thierry	Pneumologie
	VERRET Jean-Luc	Dermato-vénérérologie

MM	VERNY Christophe	Neurologie
	WILLOTEAUX Serge	Radiologie et imagerie médicale
	ZANDECKI Marc	Hématologie ; transfusion
<u>MAÎTRES DE CONFÉRENCES</u>		
M.	ANNAIX Claude	Biophysique et médecine nucléaire
Mmes	BEAUVILLAIN Céline	Immunologie
	BELIZNA Cristina	Médecine interne, gériatrie et biologie du vieillissement
	BLANCHET Odile	Hématologie ; transfusion
M.	BOURSIER Jérôme	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
Mme	BOUTON Céline	Médecine générale (maître de conférences associé)
MM	BOUYE Philippe	Physiologie
	CAILLIEZ Éric	Médecine générale (maître de conférences associé)
	CAPITAIN Olivier	Cancérologie ; radiothérapie
	CHEVAILLER Alain	Immunologie
Mme	CHEVALIER Sylvie	Biologie cellulaire
MM	CRONIER Patrick	Anatomie
	CUSTAUD Marc-Antoine	Physiologie
Mme	DUCANCELLÉ Alexandra	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
MM	DUCLUZEAU Pierre-Henri	Nutrition
	EVEILLARD Matthieu	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
	FORTRAT Jacques-Olivier	Physiologie
	GALLOIS Yves	Biochimie et biologie moléculaire
	HINDRE François	Biophysique et médecine nucléaire
	JEANGUILLAUME Christian	Biophysique et médecine nucléaire
Mme	JOUSSET-THULLIER Nathalie	Médecine légale et droit de la santé
M.	LETOURNEL Franck	Biologie cellulaire
Mmes	LIBOUBAN Hélène	Biologie cellulaire
	LOISEAU-MAINGOT Dominique	Biochimie et biologie moléculaire
	MAY-PANLOUP Pascale	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
	MESLIER Nicole	Physiologie
MM	MOUILLE Jean-Marc	<i>Philosophie</i>
	NICOLAS Guillaume	Neurologie
	PAPON Xavier	Anatomie
Mmes	PASCO-PAPON Anne	Radiologie et Imagerie médicale
	PELLIER Isabelle	Pédiatrie
	PENCHAUD Anne-Laurence	<i>Sociologie</i>
M.	PIHET Marc	Parasitologie et mycologie
Mme	PRUNIER Delphine	Biochimie et biologie moléculaire
M.	PUISSANT Hugues	Génétique
Mmes	ROUSSEAU Audrey	Anatomie et cytologie pathologiques
	SAVAGNER Frédérique	Biochimie et biologie moléculaire
MM	SIMARD Gilles	Biochimie et biologie moléculaire
	TURCANT Alain	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique

COMPOSITION DU JURY

Président du jury :

Monsieur le Professeur BOUCHARA Jean-Philippe

Directeur de thèse :

Monsieur le Professeur ZANDECKI Marc

Membres du jury :

Monsieur le Professeur DUVAL Olivier

Monsieur le Professeur REYNIER Pascal

Monsieur le Professeur ZANDECKI Marc

A Monsieur le Professeur Jean-Philippe BOUCHARA,

Vous m'avez accueilli dans votre service. J'ai pu bénéficier de vos connaissances en Mycologie, qui continueront à me guider dans ma pratique.

Vous me faites l'honneur de présider ce jury. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Marc ZANDECKI,

Vous m'avez autorisé à me spécialiser en Hématologie et j'ai eu la chance de passer deux semestres dans votre service. Vous m'avez fait profiter avec bienveillance de votre savoir, de vos compétences et de votre expérience. Pour l'attention que vous portez à la formation des internes. Que ce manuscrit soit la marque de tout l'intérêt que je porte à votre discipline.

Vous m'avez fait l'honneur de me confier ce travail, et avez accepté aujourd'hui de le juger. Pour votre disponibilité, vos encouragements et votre patience. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude et l'assurance de mes sentiments les meilleurs.

A Monsieur le Professeur Pascal REYNIER,

Vous m'avez accueilli dans votre service. Vous et votre équipe de Biologie moléculaire m'avez donné le goût de la recherche et de l'écriture.

Vous me faites l'honneur d'évaluer ce travail. Veuillez croire à l'assurance de ma sincère considération.

A Monsieur le Professeur Olivier DUVAL,

Vous avez accepté avec spontanéité d'être membre de ce jury. Soyez assuré de toute ma reconnaissance.

Aux Docteurs Marie DAUTEL, Richard GARAND, Franck GENEVIEVE, Alban GODON, Laurent MACCHI, Anne-Marie OSTA, Catherine TERNISIEN, Anne TESSIER-MARTEAU et Marc TROSSAERT,

En remerciement de tout ce que vous m'avez appris et de tout ce que j'apprends encore en Hématologie cellulaire, Hémostase et Immuno-Hématologie.

Au Professeur Dominique CHABASSE et aux Docteurs Ludovic de GENTILE, Bernard CIMON et Marc PIHET,

Pour m'avoir fait partager vos connaissances en Parasitologie et Mycologie et pour la confiance que vous m'avez accordée.

Aux Professeurs Marie-Laure JOLY-GUILLOU et Vincent PROCACCIO et aux Docteurs Valérie MOAL et Béatrice LESIMPLE,

Pour leur professionnalisme et leur disponibilité.

A Isabelle, Sébastien et François,

Vous avez été mes co-internes, vous avez été aussi pour moi des chefs bienveillants.

A Amélie, Gabriel, Maxime, Pierre-Antoine, Sylvain, Céline, Florine, Charles, Armand, Lisa, Lucile, Juan, Julien, Harmony, Sophie, Marine, Benjamin, Noémie, Anne-Sophie, Elise et tous les autres,

Ce fut un plaisir de vivre mon internat avec vous.

En souvenir de tous ces bons moments.

Aux différentes équipes des laboratoires qui m'ont accueilli, au CHU d'Angers, puis au CHU de Nantes et maintenant au CH de Cholet,

Pour leur générosité, leur gentillesse et leur bonne humeur.

A ma grand-mère,

J'aurais été tellement fier que tu sois présente aujourd'hui.

Avec toute ma tendresse.

A mes parents,

Pour votre amour.

Pour votre confiance, vos encouragements, votre écoute et votre soutien inconditionnel.

Merci de m'avoir tant donné. J'espère pouvoir un jour être un parent à votre image.

A ma sœur et son époux, Sophie et Thomas,

Pour votre présence et notre complicité ainsi que pour tout ce que vous avez fait pour moi depuis le début de mes études.

A ma filleule, Camille,

Pour tout le bonheur que tu nous apportes depuis quatre ans.

A mon neveu, Clément,

Pour toute la joie que tu nous donnes déjà.

A mon parrain, mes oncles, tantes, cousins et cousines,

Qui ont vu le p'tit dernier grandir...

A mes amis, les bretons, les parisiens, les nantais et les angevins,

Avec une mention spéciale pour ceux qui seront présents aujourd'hui.

Je dédie cette thèse.

Liste des abréviations

AbnLy:	abnormal lymphocytes
CBC(s):	Cell Blood Count(s)
DIFF:	differential
FSC:	forward-scatter
HA(s):	hematology analyser(s)
HFR:	high fluorescence reticulocytes
HGB:	hemoglobin
HRP II:	histidin rich protein II
IG:	immature granulocytes
IPF%:	immature PLT fraction
IRF:	immature reticulocyte fraction
LFR:	low fluorescence reticulocytes
MAPSS:	multiple-angle polarisation scatter separation
MFR:	medium fluorescence reticulocytes
MGG:	May-Grünwald et Giemsa
NCCLS:	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NFS:	numération formule sanguine
OMS:	Organisation Mondiale de la Santé
<i>P</i> -species:	<i>Plasmodium</i> species
PCR:	polymerase chain reaction
PCT:	plateletocrit
<i>Pf</i> :	<i>P. falciparum</i>
pLDH:	<i>Plasmodium</i> lactate dehydrogenase
PLT-O:	optical PLT count
PLT(s):	platelet(s)
<i>Pm</i> :	<i>P. malariae</i>
<i>Po</i> :	<i>P. ovale</i>
PP:	predicted probability
<i>Pv</i> :	<i>P. vivax</i>
RBC(s):	Red Blood Cell(s)
RDW-SD:	RBC distribution width-standard deviation
ROC:	receiver operating characteristic

SSC: side-scatter

TDR: test de diagnostic rapide

VCS: volume, conductivity and scatter

WBC(s): White Blood Cell(s)

Plan

PREAMBULE

1. Le paludisme
2. Limites du diagnostic biologique conventionnel
3. Place des automates d'hématologie dans l'aide au diagnostic de paludisme

ARTICLE

1. Summary
2. Introduction
3. Materials and Methods
4. Results
5. Discussion
6. Figures and tables

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

TABLE DES MATIERES

Préambule

1. Le paludisme

1.1. Définition et épidémiologie

Le paludisme est une parasitose due à des hématozoaires du genre *Plasmodium*, transmise par la piqûre d'un moustique, l'anophèle femelle. C'est une maladie fréquente et mortelle dans les régions tropicales et subtropicales, qui touche les populations vivant en zone d'endémie comme les voyageurs. Ainsi, environ 219 millions d'accès palustres sont survenus dans le monde en 2010, entraînant la mort de 660 000 personnes [1]. Chaque année, plus de 125 millions de voyageurs visitent les zones d'endémie et 10 000 à 30 000 d'entre eux déclarent la maladie après leur retour [2].

1.2. Agent pathogène et cycle parasitaire

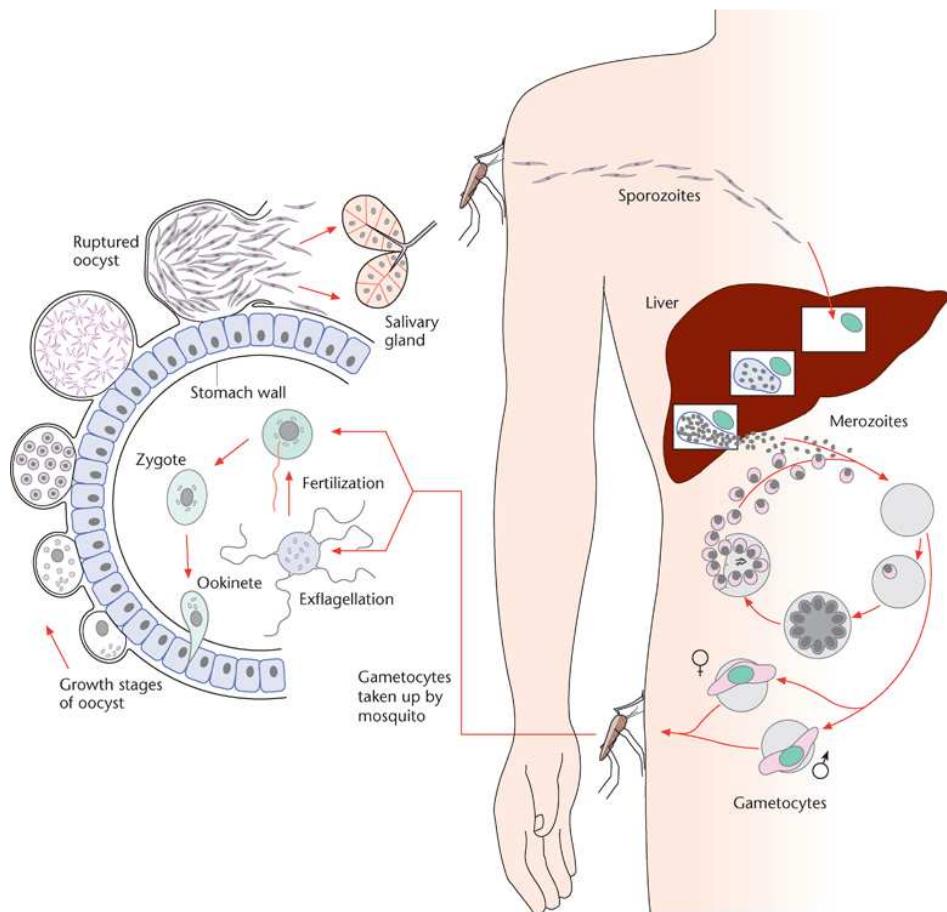
Les cinq espèces de *Plasmodium* susceptibles d'infester l'Homme sont *P. falciparum* (*Pf*), *P. vivax* (*Pv*), *P. ovale* (*Po*), *P. malariae* (*Pm*) et *P. knowlesi*. Les infections les plus sévères (potentiellement mortelles) sont dues à *Pf*, qui était l'espèce responsable en 2011 de plus de 80% des 3560 cas de paludisme d'importation en France [3]. *P. knowlesi* était initialement connu pour être un parasite du Singe. Sa pathogénicité chez l'Homme est de découverte plus récente [4] et il est donc rarement mentionné dans les études publiées.

Lors de sa piqûre, l'anophèle inocule des sporozoïtes dans un capillaire sanguin (Fig. 1). Les parasites qui parviennent à gagner le foie se transforment en schizontes pré-érythrocytaires et prolifèrent dans les hépatocytes. Après quelques jours, les schizontes éclatent et libèrent des milliers de merozoïtes qui vont rapidement infecter les hématies. Le parasite se différencie en trophozoïte puis en schizonte. L'hématie est ensuite lysée et libère entre 8 et 32 nouveaux merozoïtes, qui vont infecter d'autres hématies et débuter un nouveau cycle érythrocytaire. Après plusieurs cycles de développement asexué, certains merozoïtes se transforment en gamétoцитes (forme sexuée). Après ingestion par l'anophèle femelle lors d'un repas sanguin, les gamétoцитes mâle et femelle fusionnent pour former un zygote (ookinète) dans le tube digestif du moustique. L'ookinète se transforme en oocyste dans lequel des sporozoïtes se multiplient puis gagnent les glandes salivaires de l'anophèle pour être injectés avec la salive lors d'une piqûre.

Ainsi, l'analyse du cycle parasitaire permet de comprendre quels sont les différents stades de développement qui pourront être observés dans le sang périphérique (trophozoïtes, schizontes ou gamétoцитes). *Pf* se distingue là encore de *Pv*, *Po* et *Pm*. En effet, par opposition à ces trois espèces, dans l'infection à *Pf* on ne trouve habituellement dans le sang périphérique que des trophozoïtes de

forme annulaire (le développement se poursuivant ensuite dans les capillaires profonds) et des gamétocytes.

Figure 1: Cycle parasitaire de *Pf*



D'après [5]

1.3. Diagnostic

1.3.1. Signes d'orientation clinico-biologiques

L'accès palustre de primo-invasion est marqué par l'apparition brutale d'une fièvre avec frissons, sueurs, asthénie, myalgies, céphalées et troubles digestifs. L'accès palustre à *Pf* peut évoluer vers un accès grave et se manifester par des signes neurologiques (troubles de conscience, convulsions, prostration) ou d'autres manifestations viscérales (détresse respiratoire, œdème pulmonaire, insuffisance rénale, collapsus circulatoire, anémie grave, hypoglycémie, acidose métabolique). A ce stade de la maladie et en l'absence de traitement, un paludisme grave est le plus souvent mortel. Le diagnostic du paludisme est donc une urgence et doit être évoqué devant toute fièvre au retour d'une zone d'endémie, afin de réduire les complications et la mortalité liées à la maladie. Les principaux signes d'orientation biologiques sont la thrombopénie, l'anémie, la lymphopénie, l'absence de polynucléose neutrophile ainsi que les stigmates d'une hémolyse et l'élévation modérée des transaminases.

1.3.2. Diagnostic de certitude

En l'absence de symptôme spécifique de la maladie, le diagnostic de certitude repose sur la mise en évidence des hématozoaires dans le sang circulant par l'examen microscopique. Le frottis sanguin (coloré au May-Grünwald et Giemsa (MGG)) et la goutte épaisse (colorée au Giemsa) sont les techniques diagnostiques de référence. Le frottis sanguin permet de déterminer l'espèce plasmodiale, le stade de maturation du parasite et la parasitémie. Le seuil de détection du frottis est de 100 à 200 parasites/ μ L. La goutte épaisse est une technique complémentaire du frottis: sa sensibilité est meilleure (5 à 50 parasites/ μ L) mais sa lecture nécessite un microscopiste expérimenté car les parasites sont plus difficiles à identifier [6]. L'analyse microscopique peut également mettre en évidence des leucocytes mélanifères. Ce sont des polynucléaires neutrophiles ou des monocytes, qui ont phagocyté des mottes de pigment malarique (hémozoïne) relarguées lors de la lyse des hématies.

En zone d'endémie et en l'absence de matériel de microscopie, les tests de diagnostic immunochromatographique permettent d'obtenir une orientation diagnostique rapide avec une grande simplicité d'utilisation. Leur principe consiste à déposer un volume de sang sur une bandelette de nitrocellulose, laquelle est sensibilisée par des anticorps monoclonaux spécifiques détectant des antigènes plasmodiaux. Cependant, dans le diagnostic du paludisme d'importation, le test de diagnostic rapide (TDR) ne peut être qu'un complément à l'examen microscopique en raison des différents faux négatifs ou faux positifs de cette technique et de son incapacité à évaluer une parasitémie ou à faire le diagnostic précis de toutes les espèces [7].

2. Limites du diagnostic biologique conventionnel

Devant un syndrome fébrile survenant en zone d'endémie, l'accès palustre est rapidement suspecté par les cliniciens. Les examens biologiques permettant d'affirmer ou d'infirmer le diagnostic sont donc le plus souvent prescrits lorsqu'ils sont disponibles.

En zone non endémique, le paludisme d'importation est lui plus difficile à évoquer, surtout si la notion de voyage manque à l'interrogatoire. Ainsi, dans une étude analysant 185 décès liés au paludisme aux États-Unis, 67.8% des patients n'ont pas été diagnostiqués lors de la première consultation et 66.7% des décès évitables ont été attribués à une erreur médicale [8]. De plus, les laboratoires rarement confrontés aux suspicions de paludisme manquent d'expertise microscopique, ce qui peut conduire à un diagnostic biologique erroné [9].

3. Place des automates d'hématologie dans l'aide au diagnostic de paludisme

La numération formule sanguine (NFS) automatisée étant devenue systématique dans l'évaluation d'un syndrome fébrile, une méthode de détection du paludisme incorporée à l'automate d'hématologie pourrait aider à détecter les cas de paludisme plus rapidement. Elle serait d'autant plus intéressante pour détecter les cas ayant échappé à la suspicion clinique et ainsi réduire la mortalité liée à l'infection par le paludisme.

Le premier automate d'hématologie contemporain dont les performances dans le diagnostic du paludisme ont été publiées est le Cell-Dyn (Abbott Diagnostics, Santa Clara, CA, USA) [10]. Le potentiel des Cell-Dyn a été ensuite confirmé à plusieurs reprises alors que ce n'est que plus récemment qu'ont été étudiées les performances des Coulter Gen.S, LH 750 et DxH 800 (Beckman Coulter, Miami, FL, USA) et du Sysmex XE-2100 (Sysmex Corporation, Kobe, Kansai, Japan). Tous ces automates fonctionnent sur un principe de mesure commun, la cytométrie en flux.

3.1. Automates Abbott Cell-Dyn

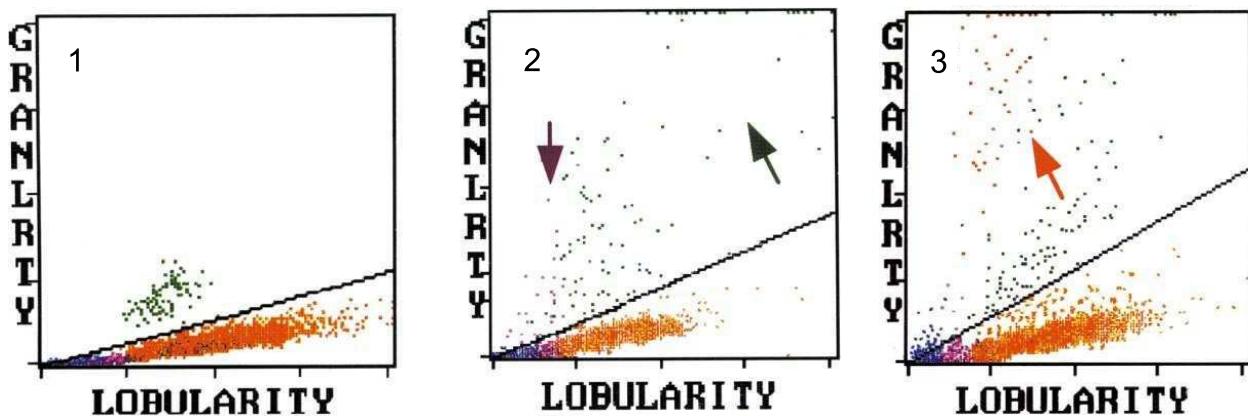
3.1.1. Principes analytiques et anomalies observées au cours du paludisme

La numération leucocytaire et la formule sont réalisées simultanément par une méthode optique: la diffraction laser multi-angulaire (technologie MAPSS: multiple-angle polarisation scatter separation). La diffraction de la lumière renseigne: à 0° sur la taille de la cellule, à 7° sur la complexité cellulaire, à 90° sur la lobularité du noyau et à 90° en lumière dépolarisée sur la granularité. Après dégranulation artificielle des polynucléaires basophiles, les éléments sont séparés en deux groupes en fonction de la diffraction à 7° et 90°: le premier groupe est constitué des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles et le second est représenté par les lymphocytes, monocytes et polynucléaires basophiles. La séparation entre lymphocytes, monocytes et polynucléaires basophiles se fait sur la taille (0°) et la complexité (7°) cellulaire. Les polynucléaires éosinophiles sont différenciés des polynucléaires neutrophiles par la capacité de leurs granulations à dépolariser le faisceau lumineux.

La fenêtre lobularité/granularité qui étudie la lumière polarisée à 90° vs la lumière dépolarisée à 90° identifie donc les polynucléaires éosinophiles et, en cas de paludisme, elle détecte les leucocytes mélanifères sous la forme de points violettes ou verts de localisation anormale (flèches violette et verte, Fig. 2.2). La nature de ces points (monocytes ou polynucléaires neutrophiles contenant de l'hémozoïne) a été confirmée par des mesures de cytométrie en flux combinées à une analyse d'événements rares [11, 12] ainsi que par l'analyse de nuages de points générés sur un

Cell-Dyn 3200 par des échantillons contenant des monocytes ayant phagocyté de l'hémozoïne *in vitro* [13].

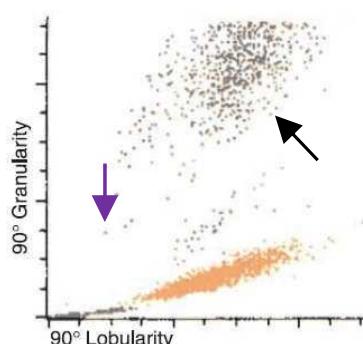
Figure 2: Fenêtres lobularité/granularité de Cell-Dyn 3500



D'après [14]; points verts: polynucléaires éosinophiles; points violettes: monocytes; points oranges: polynucléaires neutrophiles; points bleus: lymphocytes; points rouges: hématies résistantes à la lyse; la ligne diagonale correspond à la séparation optimale entre polynucléaires éosinophiles et neutrophiles; 1) tracé normal; 2) infection à *Pf*, avec monocytes dépolarisants ayant phagocyté de l'hémozoïne (flèche violette) et polynucléaires neutrophiles avec pigments classés à tort en polynucléaires éosinophiles (flèche verte). Les points bleus dépolarisés pourraient correspondre à des petits monocytes contenant de l'hémozoïne, classés à tort en lymphocytes; 3) infection à *Pv* avec des hématies résistantes à la lyse (flèche rouge) contenant probablement de l'hémozoïne

Dans les infections à *Pv*, les points rouges (hématies résistantes à la lyse) pourraient correspondre à des hématies parasitées et contenant de l'hémozoïne (flèche rouge, Fig. 2.3) [14]. Les nuages de points noirs (éléments inclassables) observés avec le Cell-Dyn 4000 (Fig. 3), pourraient correspondre à des hématies contenant de l'hémozoïne et résistantes à la lyse ou aux formes matures du parasite, riches en hémozoïne. Cette dernière hypothèse pourrait expliquer l'absence de nuages de points noirs dans les infections à *Pf*, pour lesquelles les formes matures ne sont pas observées [15].

Figure 3: Fenêtre lobularité/granularité de Cell-Dyn 4000 dans une infection à *Pv*



D'après [16]; monocytes contenant de l'hémozoïne (points violettes) dans la zone des polynucléaires éosinophiles (flèche violette) avec un nuage de points noirs (flèche noire) pouvant correspondre aux formes matures de *Pv*

D'autres anomalies ont été décrites au cours du paludisme dans d'autres fenêtres du Cell-Dyn. Dans la fenêtre taille/granularité, qui étudie la lumière transmise à 0° vs la lumière dépolarisée à 90°, des évènements de petite taille et de granularité élevée sont décrits, notamment dans les infections à *Pv*. Ils pourraient correspondre à des formes matures du parasite, riches en hémozoïne ou à des fantômes d'hématies riches en hémozoïne [15]. Dans la fenêtre des réticulocytes, qui étudie la fluorescence vs la lumière transmise à 7°, les anomalies rapportées concernent le plus souvent les infections à *Pf*. Les histogrammes des réticulocytes peuvent montrer une pseudo-réticulocytose avec un pic de fluorescence supplémentaire et une fraction immature des réticulocytes anormalement élevée [17], conséquence de la présence intra-érythrocytaire de matériel nucléaire parasitaire. Enfin, dans les infections à *Po* [18] ou à *Pm* [19], il semblerait que les anomalies observées sur le Cell-Dyn se rapprocheraient de celles observées pour les infections à *Pv*.

3.1.2. Performances diagnostiques

De nombreuses études ont évalué les performances diagnostiques du Cell-Dyn. Le principal critère diagnostique étudié était la présence de points dépolarisés de localisation anormale dans la fenêtre lobularité/granularité [10, 12, 13, 16, 18-26]. La sensibilité dans ces 13 études variait de 48.6% à 100%, les valeurs les plus basses étant rapportées aux cas de paludisme d'importation alors que la sensibilité dépassait le plus souvent 90% en zone d'endémie. Cette différence serait expliquée par la présence d'un faible taux de leucocytes mélanifères lors des accès palustres des patients non-immuns, alors que les patients immuns, fréquemment ré-infectés et tolérant des parasitoses plus importantes, présentent des taux de leucocytes mélanifères supérieurs lorsqu'ils deviennent symptomatiques. La spécificité était bonne (de 78.5% à 100%), sauf dans une étude où la spécificité était de 25.3% [26]. Ces résultats discordants soulignent l'importance de définir précisément les zones dans lesquelles la présence d'un point dépolarisé doit être considérée comme significative. Ceci pourrait en effet réduire le taux de faux positifs et surtout, permettrait de générer des messages d'alarme par l'automate afin d'identifier les échantillons suspects.

3.2. Automates Coulter Gen.S et LH 750

3.2.1. Principes analytiques et anomalies observées au cours du paludisme

La numération leucocytaire est réalisée en méthode impédance. L'histogramme généré (volume vs nombre de cellules) différencie les leucocytes des érythroblastes, plaquettes et débris à partir d'un seuil de volume de 35 fL.

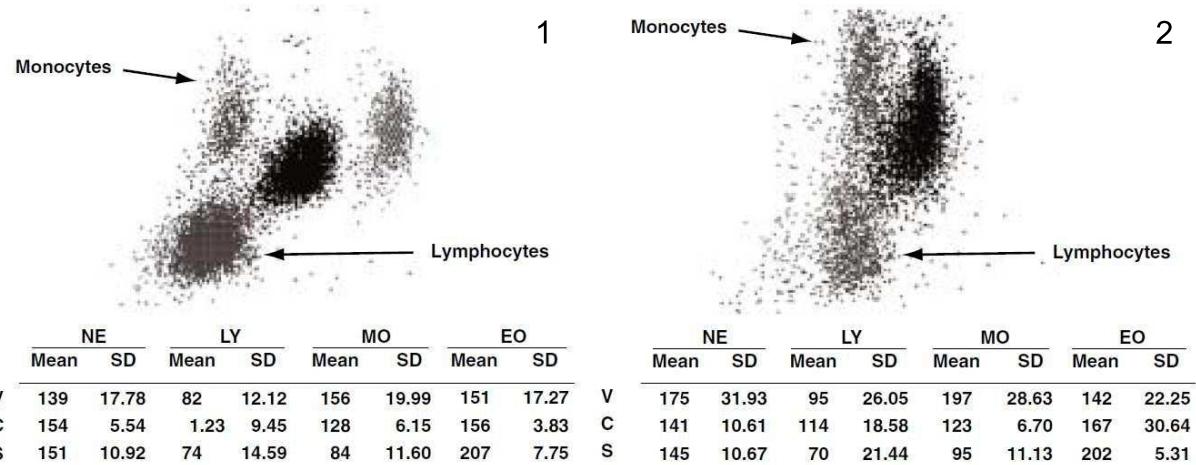
La formule sanguine est générée sur la base de trois mesures physiques (technologie VCS: volume, conductivity and scatter): la variation d'impédance en courant continu qui permet d'évaluer le volume de chaque cellule analysée, la radiofréquence en courant alternatif de haute fréquence qui permet d'évaluer une valeur moyenne de conductivité et qui renseigne sur les caractéristiques

nucléaires, et enfin la mesure de la diffraction d'un faisceau laser qui renseigne sur la granularité des cellules. Ces données permettent d'obtenir la proportion de chaque type cellulaire (lymphocytes, monocytes, polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et basophiles). Parallèlement, une fenêtre biparamétrique en nuages de points (diffraction *vs* volume) est disponible, ainsi que les données positionnelles des lymphocytes, monocytes, polynucléaires neutrophiles et éosinophiles (moyenne de chacune des trois mesures acquises et leur écart-type). Des règles de décision, définies par l'utilisateur, peuvent associer ces données positionnelles à d'autres critères, quantitatifs par exemple.

Les deux principaux paramètres modifiés dans les échantillons infectés sont les écarts-types des volumes lymphocytaires et monocytaire (Fig. 4.2). Ces anomalies reflèteraient un certain degré d'anisocytose, conséquence de l'activation cellulaire en réponse à l'infection [27, 28].

Lors de la numération leucocytaire des échantillons infectés, l'histogramme volumétrique peut également présenter un pic précédent le seuil de 35 fL. Ce pic pourrait survenir du fait d'anomalies des hématies ou des plaquettes, mais serait peu spécifique du paludisme [27].

Figure 4: Fenêtres diffraction/volume de LH 750 avec données positionnelles des sous-populations leucocytaires et formule du “Malaria factor”



$$\text{Malaria factor : } \frac{V_{SD}(\text{lymphocytes}) \times V_{SD}(\text{monocytes})}{100}$$

D'après [28]; NE: polynucléaires neutrophiles; LY: lymphocytes; MO: monocytes; EO: polynucléaires éosinophiles; 1) tracé normal; 2) infection à *Pf* avec importante hétérogénéité des volumes lymphocytaires et monocytaires. D'après [27]; V_{SD} (lymphocytes): écart-type des volumes lymphocytaires; V_{SD} (monocytes): écart-type des volumes monocytaires

3.2.2. Performances diagnostiques

En considérant les écarts-types des volumes lymphocytaires et monocytaires, la sensibilité était supérieure à 90% et la spécificité supérieure à 60%, pour chacun des deux paramètres. Pour améliorer la spécificité, les deux paramètres ont été combinés pour établir un “Malaria

factor” (Fig. 4), lequel permettait d’obtenir une sensibilité de 96.9% et une spécificité de 82.5%, à la valeur seuil optimale de 5.06 en courbe ROC (receiver operating characteristic) [27]. Les études ultérieures retrouvaient une sensibilité de 98% avec une spécificité de 94% (à la valeur seuil optimale de 3.7) d’une part [28] et une sensibilité de 81.8% avec une spécificité de 72.3% (à la valeur seuil optimale de 4.57) d’autre part [29]. De plus, la valeur seuil du “Malaria factor” ne semblait pas modifiée par l’espèce plasmodiale [28]. Ainsi, et au même titre que pour les automates Cell-Dyn, l’intégration du “Malaria factor” au système d’analyse de l’automate, permettrait d’informer l’utilisateur de la présence possible de paludisme.

3.3. Automate Coulter DxH 800

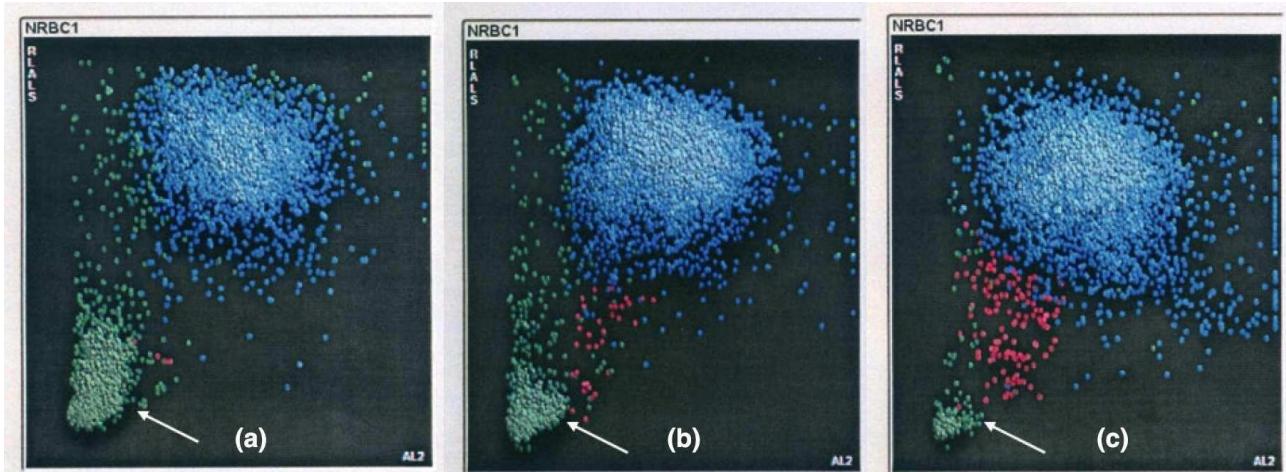
3.3.1. Principes analytiques et anomalies observées au cours du paludisme

Le DxH 800 est le plus récent des analyseurs d’hématologie cellulaire de Beckman Coulter. Parallèlement aux mesures de volume et de conductivité communes aux générations précédentes, l’automate mesure trois diffractions distinctes: la diffraction de la lumière à angle moyen, le niveau bas de la diffraction de la lumière à angle moyen ($9 - 19^\circ$) et le niveau haut de la diffraction de la lumière à angle moyen ($20 - 43^\circ$), lesquels renseignent sur la surface membranaire et la granularité des cellules. Le DxH 800 mesure également la diminution du signal à $0 - 0.5^\circ$, qui informe sur la transparence cellulaire, et la diffraction de la lumière à angle réduit (5.1°) qui permet d’évaluer la complexité cellulaire.

Les érythroblastes sont analysés dans un canal spécifique, en utilisant cependant la même cellule de mesure que pour la formule leucocytaire. Pour l’analyse, l’échantillon de sang total est dilué et traité avec un agent de lyse qui détruit électivement les hématies anucléées (l’intégrité des leucocytes, des érythroblastes, des plaquettes et des débris cellulaires étant préservée). Pour l’analyse, l’automate utilise la diminution du signal à $0 - 0.5^\circ$ (mesure de la lumière absorbée par la cellule), un séparateur entre érythroblastes et interférences potentielles et un indicateur de taille cellulaire prenant en compte la transparence cellulaire. Un algorithme permet alors de séparer les cellules et renseigne sur la présence éventuelle de plaquettes géantes, d’amas plaquettaires ou d’autres débris [30].

Une étude a été publiée sur les conséquences des infections à *Pv* au cours de l’hémogramme automatisé généré avec le DxH 800 [31]. On retrouve dans les échantillons infectés par *Pv*, des nuages de points denses, arrondis ou fusiformes à grand axe vertical, dans les fenêtres érythroblastes de l’automate (Fig. 5). Les éléments de ces nuages présentent une faible diffraction de la lumière à angle réduit, une faible diminution du signal à $0 - 0.5^\circ$ et une faible diffraction de la lumière à angle moyen (niveau haut). Ils pourraient correspondre à des gamétocytes.

Figure 5: Fenêtres érythroblastes de DxH 800 dans trois infections distinctes à *Pv*



D'après [31]; points verts: hématies impaludées (flèche); points rouges: érythroblastes; points bleus: leucocytes; (a) parasitémie de $68 \times 10^9/L$; (b) parasitémie de $5.7 \times 10^9/L$; (c) parasitémie de $0.4 \times 10^9/L$. La taille des nuages de points d'hématies impaludées est approximativement corrélée avec la parasitémie

3.3.2. Performances diagnostiques

La sensibilité et la spécificité étaient de 100% et la taille des nuages semblait approximativement corrélée avec la parasitémie (Fig. 5). Cependant, d'autres études sont nécessaires pour confirmer ces résultats et pour évaluer les performances diagnostiques du DxH 800 avec les autres espèces plasmodiales (et notamment *Pf*). Il pourrait néanmoins être intéressant que le fabricant intègre un message d'alarme en cas de nuage anormal, avec une évaluation de la parasitémie en tenant compte du nombre de signaux présents.

3.4. Automates Sysmex XE-2100 et XE-5000

Le Sysmex XE-2100 a déjà fait l'objet d'études portant sur ses capacités à détecter le paludisme. Cependant, ces publications concernent surtout les infections à *Pv* [32].

Dans l'article présenté ci-après, les performances du XE-2100 et du XE-5000 (version optimisée du XE-2100) ont été évaluées pour le diagnostic du paludisme en zone non endémique. Ce sont principalement les infections à *Pf* qui ont été étudiées (49 échantillons), les 18 autres échantillons étant impaludés à *Pv*, *Po* ou *Pm*. Seront présentés successivement: les principes analytiques de l'automate XE, les hémogrammes des patients impaludés, les anomalies retrouvées spécifiquement au cours du paludisme et enfin les performances diagnostiques du XE en fonction des espèces en cause.

Article

Use of Sysmex XE-2100 and XE-5000 hematology analysers for the diagnosis of malaria in a non-endemic country (France).

P. DUBREUIL^{*}, M. PIHET[†], S. CAU^{*}, S. CROQUEFER^{*}, P. A. DEGUIGNE^{*}, F. GENEVIEVE^{*}, L. DE GENTILE[†], M. ZANDECKI^{*}

^{*}Laboratory of Hematology, Biology Institute in Health, University Hospital of Angers, Angers, France

[†]Laboratory of Parasitology-Mycology, Biology Institute in Health, University Hospital of Angers, Angers, France

Correspondence:

Marc Zandecki, Laboratory of Hematology, Biology Institute in Health, University Hospital of Angers, 4 rue Larrey, 49933 Angers cedex 9, France.

Tel.: +33 2 41 35 53 53;

Fax: +33 2 41 35 55 99;

E-mail: mazandecki@chu-angers.fr

Keywords

Malaria, Cell Blood Count, Hematology Analysers, Sysmex XE-2100, Sysmex XE-5000

Competing interests: the authors have no competing interests

1. Summary

Introduction: Automated hematology analysers are of widespread use and several of them have shown peculiar changes helpful for the diagnosis of malaria. However most studies are conducted in endemic regions and it is not always clear whether all malarial parasites or only some species are in concern.

Methods: We retrospectively studied Cell Blood Counts (CBCs) performed with Sysmex XE-2100 and XE-5000 hematology analysers in our centre (Angers, France) regarding 67 patients returning from endemic areas and infected with various *Plasmodium* species [*P. falciparum* ($n = 49$), *P. vivax* ($n = 15$), *P. ovale* ($n = 1$), *P. malariae* ($n = 2$)].

Results: In 83% of infected samples with *P. vivax*, *P. ovale*, or *P. malariae*, peculiar or extra clouds of dots were present in neutrophil and/or eosinophil area(s) of routine differential (DIFF) scattergram. Comparison between White Blood Cell (WBC) counts performed in WBC[BASO] and WBC[DIFF] channels showed that abnormal areas in DIFF scattergrams were linked to unlysed Red Blood Cells (RBCs) containing mature forms. In contrast, regarding *P. falciparum* infection, routine DIFF scattergrams failed to demonstrate any peculiar or specific change (0/49 patients). *P. falciparum*-infected RBCs were fully lysed by reagents, explaining the absence of abnormal areas on scattergrams. If it was impossible to hypothesise *P. falciparum* infection using routine CBC analysis, diagnostic models recently developed for the diagnosis of *P. falciparum* malaria in endemic countries were useful and demonstrated a sensitivity level of 77.1%. Reticulocyte analysis showed that immature reticulocyte fraction (IRF) was significantly lower in *P. falciparum*-infected samples than in other *Plasmodium* species ($6.5 \pm 5.6\%$ vs $15.1 \pm 5.4\%$, $P < 0.05$) and the ratio reticulocyte/IRF showed a significant correlation with parasitemia ($r = 0.56$, $95\% \text{CI}[0.26 - 0.77]$, $P < 0.05$).

Conclusion: Diagnostic models for *P. falciparum* should become more accurate including reticulocyte/IRF ratio as a supplementary variable, whereas in other *Plasmodium* species, abnormal DIFF pictures are peculiar enough to hypothesise malaria after routine CBC analysis.

2. Introduction

Malaria is one of the most deadly diseases in the world and in 2010 there were an estimated 219 million patients infected worldwide, with a global number of malaria deaths estimated to 660 000 [1].

In endemic regions such as Africa, which carries 90% of the burden [33], malaria is a prime diagnostic concern in febrile patients. In contrast, travellers who develop malaria upon return to a non-endemic country may be misdiagnosed, due to physicians unfamiliar with malaria, and the

diagnosis may be delayed. Use of anti-malarial medicines may not be registered, resulting in patients presenting with severe and complicated malaria.

If the gold standard for malaria diagnosis is microscopic analysis of Giemsa-stained blood films, nowadays completed with rapid tests using immunochromatography, only suspected malaria cases are tested. As Cell Blood Counts (CBCs) are frequently performed in patients with febrile diseases, a careful study of the results provided by several automated hematology analysers (HAs) in malaria patients has shown that several changes, mainly related to abnormal White Blood Cell (WBC) scattergrams, were peculiar enough to hypothesise malaria infection in the relevant patients [32]. Therefore, the use of HAs was stressed as a help for early detection of malaria, although in some reports it was unclear whether all or only some *Plasmodium* species (*P*-species) were concerned [34]. According to the HAs used, several diagnostic indexes were developed, demonstrating a high predictive value for the diagnosis of malaria [28, 35].

Sysmex XE-2100 and XE-5000 HAs perform CBC quickly and accurately. Their ability to detect malaria in endemic countries has already been reported [36-39]. The aim of this study was to determine whether CBC performed using these HAs could help for the diagnosis of malaria in patients returning from endemic countries and admitted in a medical care unit from our institution (Angers, France). For that purpose, we retrospectively studied CBCs from 67 patients in which malaria was diagnosed using conventional methods. Routine parameters and routine WBC scattergrams were analysed first, followed by the analysis of the so-called “research parameters” provided by the HAs to look for sensitivity of recently published diagnostic models [35]. Samples from patients infected with *Pf* were especially examined and compared with those from patients infected with other *P*-species, as *Pf* malaria cases may evolve rapidly toward a severe disease and correspond up to 80% of malaria cases diagnosed in France [3].

3. Materials and Methods

3.1. Samples and reference diagnostic procedures

EDTA anti-coagulated blood samples from 67 patients with detectable malarial parasites were collected at the University Hospital of Angers (France) between March 2008 and November 2011. The diagnosis of malaria was performed using the following methods. The single-step immunological membrane rapid test (NADAL® Malaria 4 Species Test, Nal Von Minden, Germany) was used to demonstrate the histidin rich protein II (HRP II) specific for *Pf*, and *Plasmodium* lactate dehydrogenase (pLDH) expressed by *Pf*, *Pv*, *Pm* and *Po*. MGG-stained thin blood films and Giemsa-stained thick smears were examined to determine *P*-species and to ascertain the absolute number of parasites, first as the number of parasites per 200 WBCs and then as the number of parasites per liter of blood ($\times 10^9/L$), using WBC count. A polymerase chain

reaction (PCR) specific for each *P*-species was performed in all samples demonstrating less than $0.1 \times 10^9/L$ parasites, and in all samples in which *P*-species other than *Pf* were identified microscopically.

CBC was determined using either the Sysmex XE-2100 or the XE-5000 HAs (Sysmex Corporation, Kobe, Kansai, Japan). The methods used for the determination of the CBC parameters are reported elsewhere in full details [40-42]. Briefly, hemoglobin (HGB) is determined after lysis of red blood cells (RBCs) and numbers of RBCs and of platelets (PLTs) are determined using the sheath flow direct current detection principle. PLT individual volumes and PLT count allow the determination of the plateletcrit (PCT). If impedance PLT count demonstrates abnormalities (manufacturer defined or operator defined, see [40]), PLT count is determined using fluorescence technology, allowing optical PLT count (PLT-O). In this channel, PLTs are classified according to the intensity of forward-scattered light and fluorescence signals into three categories (low, medium, and high fluorescence intensity), immature PLT fraction (IPF%) corresponding to the percentage of PLTs expressing high + medium PLT fluorescence intensity. WBC count (WBC[BASO] count) is performed in a dedicated channel (WBC/BASO) after the use of a reagent which disrupts membranes of RBCs and WBCs, with the exception of basophilic polymorphs, allowing the enumeration of WBC nuclei and (unaltered) basophils. WBC differential is performed on another channel (DIFF) after addition of a mild lysis agent destroying only RBCs and of a fluorescent dye. According to light scattering and fluorescence characteristics, a 4-part WBC differential is generated (lymphocytes, monocytes, eosinophils and neutrophils + basophils). A WBC count (WBC[DIFF] count) is also performed in the DIFF channel, corresponding to the number of unlysed cells, and comparison with WBC[BASO] count is automatically performed. Several scattergrams, including WBC/BASO and DIFF scattergrams, are generated in each instance and, if relevant, suspect flags (manufacturer defined) are generated, related to qualitative changes (abnormal scattergrams). In the DIFF scattergram, central part of neutrophil and of lymphocyte areas is determined according to *X* and *Y* axes (NEUT-X, NEUT-Y, LYMPH-X and LYMPH-Y, respectively) and reported as technical variables or research parameters (in arbitrary units from the manufacturer) [43]. Reticulocyte number is performed on a dedicated channel, using a specific fluorescent dye (containing polymethine and oxazine) that binds to nucleic acids, and a dedicated scattergram allows the location of mature RBCs (no conspicuous fluorescence), low, medium, and high fluorescence reticulocytes (LFR, MFR, and HFR, respectively). MFR + HFR fractions are reported as the immature reticulocyte fraction (IRF).

Microscopic WBC differential was performed in all instances in this study after examination of MGG-stained smears prepared by the Sysmex SP-1000i slide maker.

Diagnostic models (designed to compute a predicted probability (PP) of malaria obtained from logistic regression analyses) using numerical algorithms were previously developed and published [35]. Non-observer dependent models for *Pf* and *Pv* infections were determined in this study. *Pv* model (N-OD1_{*Pv*}) included the continuous decrease of PCT in %, the continuous increment in the ratio WBC[DIFF]/WBC[BASO] and the continuous increase in the scattergram mean Y axis value for lymphocytes (LYMPH-Y). *Pf* model (N-OD1_{*Pf*}) included the continuous increase in RBC distribution width-standard deviation (RDW-SD) in fL, the continuous decrease in the PLT-O count and the continuous increase in LYMPH-Y. The accuracy of these models was tested in our study using *Pf* and *Pv* samples.

3.2. Data analysis

Data entry was performed on a basis using Microsoft Office Excel[®]. Statistical analysis was performed using both Microsoft Excel and BiostaTGV (<http://marne.u707.jussieu.fr/biostatgv/> and <http://www.r-project.org/>). Specific differences were shown using Wilcoxon-Mann Whitney test and Fisher's exact test. Comparisons were performed with Pearson's correlation. A *P*-value < 0.05 was considered statistically significant.

4. Results

4.1. Clinical and biological features

Forty eight of the 67 patients studied (71.6%) were male; median age was 29.9 (range = 1 - 68) and 12 patients were under 15. 49/67 of patients (73.1%) were infected with *Pf*, 15 (22.4%) with *Pv*, two with *Pm* and one with *Po*. Patients infected with *Pv* returned from French Guyana whereas all other patients returned from tropical Africa.

In *Pf*-infected patients, parasitemia ranged from 0.2 to $520 \times 10^9/L$ in 48/49 cases (mean = $68.7 \times 10^9/L$), and was of $2386 \times 10^9/L$ in one case. In *Pv*-, *Pm*- and *Po*-infected patients, parasitemia ranged from 0.1 to $21.3 \times 10^9/L$ (mean = $6.9 \times 10^9/L$), from 3.6 to $4.8 \times 10^9/L$ (mean = $4.2 \times 10^9/L$) and was of $1.1 \times 10^9/L$, respectively.

4.2. Red blood cells, hemoglobin, red cell indices, and platelets (Table I)

According to National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) criteria [44], the use of reference intervals defined according to gender and age showed that 44.8% of malaria patients were anemic, and their median HGB was 11.3 g/dL. Suspect flags related to RBC or to HGB determination were rare, only observed in 2 *Pf*-infected patients, and possibly related to lipid interference (Turbidity/HGB Interference?).

Thrombocytopenia was common in our study (53/67 patients; 79.1%), including 20/67 patients (29.9%) with severe thrombocytopenia, the latter corresponding in 17/20 instances to *Pf*-infection. The median PLT count was significantly lower ($34 \pm 23 \times 10^9/L$ vs $114 \pm 76 \times 10^9/L$, $P < 0.05$) and the median IPF% was significantly higher ($18.6 \pm 10.9\%$ vs $6.8 \pm 4.5\%$, $P < 0.05$) in samples displaying parasitemia $> 50 \times 10^9/L$, which was observed in 13 patients, all infected with *Pf*. PLT flagging (PLT abnormal distribution) was observed in 30.6% *Pf*-infected patients and in the two *Pm*-infected patients.

4.3. White Blood Cell parameters and their relationship with *Plasmodium* species

Automated WBC counts, microscopic differentials, and suspect flags from HAs are reported in Table II. In our study, a blood film was examined in each instance, to look for malarial parasites and to perform microscopic WBC differential. Careful examination of polymorphs and of monocytes failed to show abnormal inclusions within the relevant cells, with the exception of one patient, who demonstrated 1/25 monocytes containing microscopically visible hemozoin pigments (*Pv* infection). Whatever the *P*-species responsible for malaria, if consensus guidelines for slide review of automated analyser results, as published by the International Society for Laboratory Hematology (<http://www.islh.org/>), had been applied, microscopic review should not have been required in 12/49 and in 2/15 *Pf*- and *Pv*-infected patients, respectively.

4.3.1. White Blood Cell scattergrams and comparison between automated and microscopic differentials (Table II)

Leukopenia, lymphopenia and lymphocyte suspect flagging (Atypical lymphocytes?, Abnormal lymphocytes/Lymphoblasts?) were common, whatever the *P*-species concerned. Lymphopenia was observed in 29/49 *Pf*-infected patients (59.2%) and in 10/18 patients infected with other species (55.6%). Lymphocyte suspect flagging, corresponding to the presence of some atypical lymphocytes and/or plasma cells after microscopic analysis, was present in 13/49 (*Pf*) and in 5/18 instances (other species). Automated percentage of atypical lymphocytes was slightly higher in *Pf*-infected samples ($1.2 \pm 1.2\%$ vs $0.5 \pm 0.4\%$, $P < 0.05$), but there was no significant correlation between automated percentage of atypical lymphocytes and parasitemia, whatever the *P*-species concerned. Despite the fact that a relationship between LYMPH-Y technical variable (arbitrary unit) and parasitemia was recently reported [35], no significant association, irrespective of the *P*-species, was found ($R^2 = 0.05$ and $R^2 = 0.002$, in *Pf*- and non *Pf*-infected samples, respectively, $P > 0.05$).

a) Infection with *Plasmodium falciparum* (Table II)

WBC/BASO scattergrams did not show any anomaly in the 49 patients studied. In 23/49 patients, abnormal DIFF scattergram and/or WBC suspect flagging was(were) observed, corresponding in ten cases to flagging for immature granulocytes (Blasts?, Immature granulocytes?, Left shift?), in six cases to flagging for lymphocytic changes (Atypical lymphocytes?, Abnormal lymphocytes/Lymphoblasts?), and in seven cases to both flaggings. Parasitemia was significantly higher ($263.9 \pm 564.3 \times 10^9/L$ vs $35.3 \pm 75.6 \times 10^9/L$, $P < 0.05$) when flagging for immature granulocytes was present. Eosinophilia ($> 0.5 \times 10^9/L$) was observed once and was confirmed after microscopic study.

Comparison between automated and microscopic differentials did not show any statistical difference between absolute numbers of neutrophils, lymphocytes, monocytes, eosinophils and basophils, respectively (data not shown). Also, there was no significant difference in automated neutrophil count between *Pf*- and non *Pf*-infected patients, although percentage of immature granulocytes was slightly higher ($0.6 \pm 0.8\%$ vs $0.3 \pm 0.4\%$, $P < 0.05$) and flagging for immature granulocytes was more frequent (34.7% vs 11.1%, $P < 0.05$) in *Pf*-infected patients than in other cases.

A CBC was performed within the three days after initiating specific therapy in 14 of 49 cases: DIFF scattergrams remained normal if normal at diagnosis, or continued to display abnormalities related to immature granulocytes or to atypical lymphocytes if already observed at diagnosis.

b) Infection with other *Plasmodium* species (Table II)

WBC/BASO scattergrams showed an excess of small dots located under the low forward-scatter (FSC) threshold in 9/15 (60%) *Pv*-infected samples: such abnormality did not affect WBC count performed in the WBC/BASO channel (Fig. 6.1). This excess of dots, corresponding to debris, was consistently observed if parasitemia was $> 4 \times 10^9/L$ (9/15 patients). In *Pm*- and *Po*-infected samples, WBC/BASO scattergram was normal (parasitemia $\leq 4 \times 10^9/L$ in 2/3 cases).

In one instance DIFF scattergram was fully normal, in two instances (*Pv*-infected patients) DIFF changes corresponded to the presence of a few atypical lymphocytes, whereas in 15/18 instances (83% = 12/15, 2/2 and 1/1 *Pv*-, *Pm*- and *Po*-infected patients, respectively) peculiar DIFF scattergram abnormalities were observed, dedicated to mature neutrophil and/or to mature eosinophil area(s). Abnormalities corresponded in one instance to unseparated neutrophil and eosinophil areas (*Pv*-infected patient; Fig. 6.2), in five instances to neutrophil and eosinophil areas linked together (*Pv*-infected patients; Fig. 6.3), in one instance to the presence of two eosinophil and two neutrophil areas (*Pv*-infected patient; Fig. 6.4), in six instances to the presence of two neutrophil areas (five *Pv*-infected patients and one *Po*-infected patient; Fig. 6.5) and in two

instances to abnormally left-shifted eosinophil area (*Pm*-infected patients; Fig. 6.6). In three among these 15 instances, dual blue areas of neutrophils or grey instead of coloured areas were observed (Fig. 6.5 and 6.2), corresponding to the inability of the HA to identify accurately the corresponding areas and as a consequence to generate numerical differential count.

Occurrences of peculiar neutrophil and/or eosinophil area(s) were consistent findings in the 13 cases displaying parasitemia $> 2 \times 10^9/L$, and were observed in two of five cases displaying parasitemia $\leq 2 \times 10^9/L$.

The comparison between automated and microscopic differentials did not show statistical differences between absolute numbers of neutrophils, lymphocytes, monocytes and basophils, respectively. Automated eosinophil count displayed eosinophilia ($> 0.5 \times 10^9/L$) in four cases whereas microscopic count was within normal ranges. Pseudoeosinophilia, corresponding to a gap of more than 5% in the eosinophil count between automated and microscopic analysis, was observed in two cases: DIFF scattergrams revealed abnormal eosinophil areas in both instances (one *Pv*- and one *Pm*-infected patient) (Fig. 6.3 and 6.6).

In four patients (*Pv*-infected patients) another CBC was performed after three days of therapy: in all cases the above-described changes disappeared and DIFF scattergrams returned to normal.

4.3.2. Relationship between White Blood Cell counts and parasitemia

The comparison between WBC counts performed on DIFF and on WBC/BASO channels, corresponding to Δ WBC (WBC[DIFF] - WBC[BASO]), showed the followings: in *Pf* infection, Δ WBC ranged from -0.8 to $0.2 \times 10^9/L$ (-0.2 ± 0.2) whatever the parasitemia (Tab. II and Fig. 7.1), whereas in patients infected with other *P*-species Δ WBC ranged from -0.3 to 7 ($+1.7 \pm 2.4$). The difference was significant ($P < 0.05$). There was a clear-cut relationship between Δ WBC and parasitemia ($r = 0.91$, $95\%CI[0.73 - 0.97]$, $P < 0.05$) as shown in Figure 7.2. Enumerating separately rings and mature schizonts failed to improve statistical difference (data not shown).

These results show first, that in *Pv*, *Pm*, or *Po* infection, a variable amount of particles is present within the blood stream, destroyed by drastic lysis agents from the WBC/BASO channel but not by mild lysis agents from the DIFF channel, then that the amount of such particles raises in parallel with parasitemia, and eventually that such particles are not found in *Pf* blood samples.

4.4. Reticulocyte analysis

Determination of reticulocyte count and reticulocyte parameters was performed in 35/49, 4/15, 2/2 and 0/1 *Pf*-, *Pv*-, *Pm*- and *Po*-infected samples, respectively (Tab. III). Both automated reticulocyte counts and RET scattergrams were normal in *Pv*-, *Pm*- and *Po*-infected patients tested.

The “abnormal RET scattergram” flagging was observed in three of 35 (8.6%) *Pf*-infected patients tested. Automated reticulocyte count was high (187, 221 and $467 \times 10^9/L$) in that three instances as compared to normal values after microscopic control. These three samples demonstrated the highest parasitemias (520, 250 and $2386 \times 10^9/L$, respectively). In another patient displaying *Pf* infection and parasitemia = $322 \times 10^9/L$, RET scattergram was normal.

In 32 of 35 patients displaying normal RET scattergrams, IRF was lower in *Pf*-infected samples than in other patients ($6.5 \pm 5.6\%$ vs $15.1 \pm 5.4\%$, $P < 0.05$), corresponding to a higher number of cells displaying low fluorescence level (LFR). That latter abnormality led to an abnormal “reticulocyte ($\times 10^9/L$)/IRF (%) ratio” (research parameter), the highest values occurring in *Pf*-infected samples displaying the highest parasitemias (Tab. III). Linear regression showed significant association between parasitemia and reticulocyte/IRF ratio ($r = 0.56$, $95\%CI[0.26 - 0.77]$, $P < 0.05$).

4.5. Accuracy of diagnostic non-observer dependent models previously developed (N-OD1_{Pv} and N-OD1_{Pf})

In this study, we determined continuous variables provided by the HA for each sample, using the continuous variables which showed association with parasitemia, as selected after multivariate regression tests by Campuzano-Zuluaga *et al.* [35]. N-OD1 equations, their optimal cut-offs PP and models sensitivities obtained are reported in Table IV. In our study, due to the variables selected, all *Pv* samples and 35/49 *Pf* samples could be analysed, as PLT-O count was not performed in all instances but is needed to determine N-OD1_{Pf}. PP was above the cut-off (0.42) in 13/15 *Pv* samples (sensitivity of 86.7%) and was above the cut-off (0.29) in 27/35 *Pf* samples (sensitivity of 77.1%).

5. Discussion

HAs are now of widespread use and allow accurate and sensitive determination of CBC. Regarding changes observed in malaria, those corresponding to anemia, thrombocytopenia, and lymphopenia are reported in 15-70%, 67-95%, and 63% patients, respectively [45-50]. Although they are important for the management of the disease, such CBC changes are not specific enough to suspect malaria [51]. Other data, outing from WBC scattergrams and from “research parameters” are provided now by several HAs, and some are peculiar enough to help for the diagnosis of malaria in endemic areas [27, 28, 35, 52]. The retrospective review of CBCs provided by Sysmex XE-2100 and XE-5000 HAs in a series of 67 malaria cases imported from endemic areas to metropolitan France (non-endemic country) showed that, as far as *Pv*, *Pm* or *Po* malarias were concerned, routine WBC scattergrams showed peculiar abnormalities similar to those reported for relevant patients

diagnosed in endemic countries, with a superimposable sensitivity (83%) for accurate diagnosis [32]. In sharp contrast, although we studied 49 *Pf*-infected patients, we were unable to demonstrate any peculiar change outing from routine CBC analysis and from routine DIFF scattergrams which could lead to hypothesise malaria (sensitivity = 0%). The recently published diagnostic model for *Pv* infection (N-OD1_{Pv}) [35] allowed positive diagnosis with a sensitivity of 86.7% in our study, and, more interestingly, the diagnostic model dedicated to *Pf* infection (N-OD1_{Pf}) allowed detection of malaria in 77.1% cases.

The diagnosis of malaria using Sysmex XE-2100 HA in endemic regions has been reported by several authors, showing that DIFF scattergrams demonstrated abnormal areas for mature neutrophils and/or for eosinophils, peculiar enough to hypothesise the diagnosis of malaria in *Pv*-infected patients [35-39, 53]. In our study, DIFF scattergram changes related to imported *Pv* infection and diagnosed in France (non-endemic country) showed similar findings. Even if the number of patients tested is low, we observed superimposable changes in *Pm*- and *Po*-infected patients, showing that the peculiar DIFF scattergram changes described so far for *Pv*-infected patients are related to *Pv*, *Pm*, or *Po* infection rather than specific to *Pv* malaria [35, 38]. To the best of our knowledge, no report analysed *Pm*- and *Po*-infected samples (only one study reported a patient with a mixed *Pv* and *Pm* infection [53]). In South Korean studies [38, 39], sensitivity for *Pv* infection ranged from 46.2% to 69.4% and specificity ranged from 99.7% to 100%. In our study, sensitivity was of 80% considering *Pv* infection and was of 83% considering together *Pv*-, *Pm*- and *Po*-infected patients. As observed by others [35] and by us, the few patients who failed to show any DIFF abnormality displayed among the lowest parasite burden. Spuriously high automated eosinophil count as compared to microscopic one was stressed as frequent in the presence of *Pv* infection, observed in up to 39% *Pv*-infected patients [36, 38]. In our study pseudoeosinophilia was observed in only two patients (11%): the low number of patients tested in our series might explain this difference, but a lower parasite burden as compared to that found in patients from endemic countries [38] cannot be fully ruled out.

As far as *Pf* malaria is concerned, although we tested 49 infected patients, no case (0%) showed any among the peculiar routine WBC scattergram changes related to *Pv*, *Pm* or *Po* infection, or any else. Only a few patients showed changes related to the presence of some atypical lymphocytes and/or immature granulocytes. Our findings are in agreement with one report in which routine CBC analysis was performed using Sysmex XE-2100 HA in 30 Colombian patients infected with *Pf*, leading to similar negative results [35].

Using the so-called multiple-angle polarisation scatter separation (MAPSS) technology to generate a WBC differential, HAs from the Cell-Dyn series (Abbott Diagnostics, Santa Clara, CA,

USA) were the first to exhibit peculiar abnormalities related to malaria after CBC determination (reviewed in [32]). Whatever the *P*-species concerned, abnormalities observed were related to the presence of abnormal monocyte-coded depolarising events due to malarial pigment hemozoin ingested by monocytes and granulocytes [14]. In one instance using the same HA, one author mentioned that it was not possible to exclude the presence of unlysed RBC containing hemozoin as responsible for part of abnormal findings [15].

In *Pv*-infected patients, abnormalities of DIFF scattergrams provided by XE-2100 HA were related first with the presence of WBCs containing hemozoin [36-39, 53, 54], but Campuzano-Zuluaga *et al.* found that most of the signal abnormalities in the DIFF scattergram correlated significantly with the concentration of *Pv* mature trophozoites and schizonts, and that events in the granulocyte area were compatible with signals generated by mature forms containing hemozoin [35]. In *Pv*-, *Pm*- and *Po*-infected patients from our series, beside peculiar DIFF scattergram changes, we observed that WBC count was higher in the DIFF channel (mild hemolytic agent) as compared to that from the WBC/BASO channel (heavy membrane destruction), and that the Δ WBC was parallel to parasitemia. Stained blood films from relevant patients demonstrated mixture of mature trophozoites, schizonts and gametocytes. In contrast, *Pf* cases did not show DIFF scattergram changes and did not demonstrate differences in WBC counts between both channels, whatever parasite burden. Stained blood films from *Pf* cases showed only parasite rings. These results agree with the hypothesis of Campuzano-Zuluaga *et al.* [35]: abnormal areas observed on DIFF scattergrams from *Pv*-, *Pm*- and *Po*-infected patients are related to the presence of mature parasites, undestroyed by mild lysis agents and generating dots located close to or superimposable to neutrophil and/or to eosinophil area(s). As no mature trophozoites (nor gametocytes) were observed in our *Pf*-infected patients, DIFF scattergrams failed to demonstrate superimposable abnormalities.

If the relationship between Δ WBC and parasite burden was obvious in our *Pv*-infected patients (Fig. 7), it was not possible however to ascertain the amount of parasites as definitely as after a microscopic study: the analysis of abnormal DIFF scattergrams showed that abnormal area corresponding to trophozoites frequently spread on the threshold that discriminates between particles included within the WBC/DIFF count (above) and those that are neglected (under the threshold) (see Fig. 6.6).

Intra-erythrocytic malarial parasites contain a small amount of RNA that is stained with that from reticulocytes and, in some instances, fluorescence generated by infected mature RBCs may be sufficient enough to mimic that from “low fluorescence reticulocytes”, leading to a spuriously high number [17, 22, 52, 55-57]. In our series changes were inconspicuous in *Pv*-, *Po*- and *Pm*-infected

patients. In contrast, in *Pf*-infected patients, the number of low fluorescent reticulocytes raised in parallel with parasitemia, the highest *Pf* parasitemias being frequently associated with both abnormal RET scattergrams and spurious automated reticulocyte counts. The research parameter “reticulocyte/IRF ratio” sensitised at best that change. Campuzano-Zuluaga *et al.* did not find abnormal reticulocyte/IRF ratio in their series of 30 *Pf* malaria cases [35], but CBCs were performed up to 36 hours after blood drawing as compared to less than 3 hours in ours. *In vitro* stability of the fluorescent reticulocyte fractions is of 6 hours and could explain discordant results [58]. The use of “reticulocyte/IRF ratio” might certainly improve sensitivity of reticulocyte analysis as compared to RET scattergram, and might be included together with the other continuous variables selected for diagnostic models developed in *Pf* infection [35].

The alteration of lymphocyte and monocyte populations has been reported in malaria using Beckman-Coulter HAs (Miami, FL, USA), and lymphocyte and monocyte standard deviations of volumes, corresponding to two “research parameters”, were used to build a malaria discriminant factor to perform accurate malaria detection [27, 28]. In three published studies sensitivity ranged from 81.8% to 98% and specificity from 72.3% to 96.9% [27-29]. Sensitivity and specificity were affected neither by the nature of the *P*-species nor by parasite burden, as it was abnormal for parasitemias ranging from 0.001% to 38.9% infected RBCs [28]. Campuzano-Zuluaga *et al.* developed several non-observer dependent models for the diagnosis of *Pv* and *Pf* infections [35]. In their experience, the non-observer dependent model (N-OD1_{*Pf*}) using only continuous variables showed high sensitivity (93%) and specificity (81%). Using the same N-OD1_{*Pf*} model and data from our series, sensitivity was of 77.1%. One limitation in using this N-OD1_{*Pf*} model is that it needs PLT-O as a variable, but in routine conditions the optical count is not always determined (determined only if impedance PLT count is altered).

In non-endemic countries Sysmex XE HAs are useful to detect imported malaria in patients infected with either *Pv*, *Po* or *Pm*: peculiar abnormalities from DIFF scattergrams are similar with those described for patients diagnosed in endemic countries, are specific enough to hypothesise for this diagnosis, and sensitivity is high. In contrast, dealing with *Pf* infection, the most dangerous disease, routine CBC changes are unspecific, and DIFF scattergrams fail to demonstrate any peculiar abnormalities which could alert for malaria infection. Recently developed diagnostic models show high sensitivity and specificity, and their use, as included into computers either from Sysmex HAs or from Laboratory Information Systems, is stressed.

6. Figures and tables

Table I: Sysmex XE-2100 and XE-5000 results: RBC, HGB and PLT parameters [mean (range) and (percentage)]

	<i>Pf: n = 49</i>	<i>Pv: n = 15</i>	<i>Pm: n = 2</i>	<i>Po: n = 1</i>
RBC count ($\times 10^{12}/\text{L}$)	4.6 (2.5 - 5.7)	4.5 (3.1 - 5.6)	3.8 (3.7 - 4)	4.5
HGB (g/dL)	13 (7.4 - 16.5)	13.1 (9.4 - 15.9)	10.7 (9.9 - 11.4)	13.7
Anemia*	21 (42.3%)	7 (46.7%)	2 (100%)	0
PLT count ($\times 10^9/\text{L}$)	98 (9 - 369)	112 (40 - 406)	48 (44 - 51)	57
IPF%	10.7 (1.2 - 41.7)	7.7 (4.7 - 10.1)	13.5 (11 - 15.9)	9.5
Thrombocytopenia*	37 (75.5%)	13 (86.7%)	2 (100%)	1 (100%)
Severe thrombocytopenia ($< 50 \times 10^9/\text{L}$)	17 (34.7%)	2 (13.3%)	1 (50%)	0
PLT abnormal distribution (suspect flag)	15 (30.6%)	0	2 (100%)	0
PLT clumps? (suspect flag)	3 (6.1%)	1 (6.7%)	0	0

* according to gender and age, as determined according to NCCLS criteria [44]

Table II: Sysmex XE-2100 and XE-5000 results: automated WBC counts [mean (range)], suspect flags and abnormalities in the DIFF scattergram (percentage)

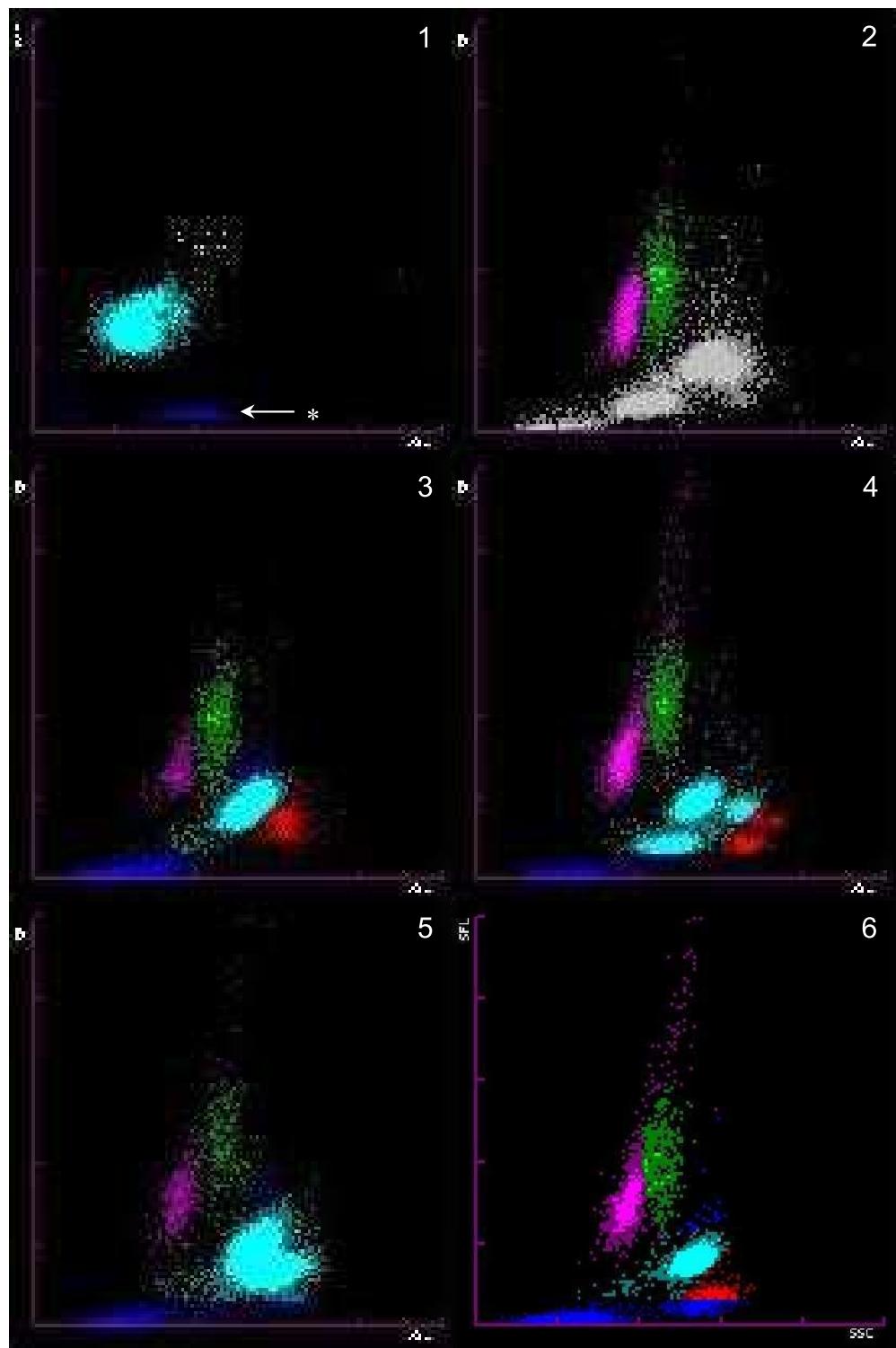
	<i>Pf: n = 49</i>	<i>Other species: n = 18</i>	<i>Pv: n = 15</i>	<i>Pm: n = 2</i>	<i>Po: n = 1</i>
WBC[BASO] count ($\times 10^9/\text{L}$)	5.3 (2.2 - 11.3)	5.7 (3 - 11)	6 (3.2 - 11)	4 (3 - 5)	4.9
WBC[DIFF] count ($\times 10^9/\text{L}$)	5.6 (2.2 - 11.2)	7.4 (3 - 13.1)	7.9 (3.7 - 13.1)	4.5 (3 - 6)	ND
Difference WBC[DIFF] - WBC[BASO] ($\times 10^9/\text{L}$)	-0.2 (-0.8 - 0.2)	+1.7 (-0.3 - 7)	+1.9 (-0.3 - 7)	+0.5 (0 - 0.9)	ND
Leukocytosis*	3 (6.1%)	1 (5.6%)	1 (6.7%)	0	0
Leukopenia*	16 (32.7%)	4 (22.2%)	3 (20%)	1 (50%)	0
Neutropenia*	5 (10.2%)	1 (5.6%)	1 (6.7%)	0	0
Lymphopenia*	29 (59.2%)	10 (55.6%)	9 (60%)	1 (50%)	0
Monocytosis*	6 (12.2%)	1 (5.6%)	1 (6.7%)	0	0
Eosinophilia*	1 (2%)	4 (22.2%)	3 (20%)	1 (50%)	0
Immature granulocytes present (IG > 1%)	6 (12.2%)	0	0	0	0
Suspect flags†:					
Blasts?	6 (12.2%)	0	0	0	0
Immature granulocytes?	2 (4.1%)	2 (11.1%)	2 (13.3%)	0	0
Left shift?	15 (30.6%)	0	0	0	0
Atypical lymphocytes?	12 (24.5%)	4 (22.2%)	3 (20%)	1 (50%)	0
Abnormal lymphocytes/Lymphoblasts?	1 (2%)	2 (11.1%)	1 (6.7%)	1 (50%)	0
DIFF scattergram:					
Normal DIFF scattergram	26 (53.1%)	1 (5.6%)	1 (6.7%)	0	0
Anomalies related to abnormal lymphocytes (AbnLy)	6 (12.2%)	2 (11.1%)	2 (13.3%)	0	0
Anomalies related to immature granulocytes (IG)	10 (20.4%)	0	0	0	0
Anomalies related to both AbnLy and IG	7 (14.3%)	0	0	0	0
Unseparated neutrophil and eosinophil areas	0	1 (5.6%)	1 (6.7%)	0	0
Neutrophil and eosinophil areas linked	0	5 (27.8%)	5 (33.3%)	0	0
Two eosinophil and two neutrophil areas	0	1 (5.6%)	1 (6.7%)	0	0
Two neutrophil areas	0	6 (33.3%)	5 (33.3%)	0	1 (100%)
Eosinophil area abnormally left-shifted	0	2 (11.1%)	0	2 (100%)	0

ND: not determined

* according to age, as determined according to NCCLS criteria [44]

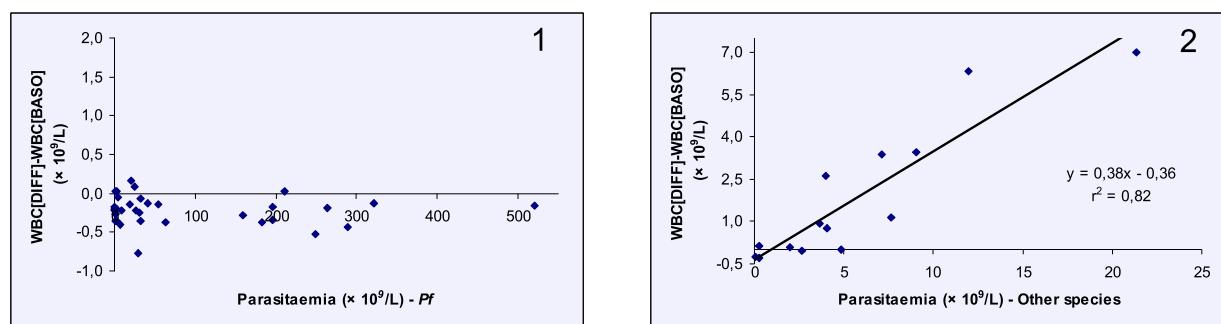
† in some patients, several suspect flags were present (see text)

Figure 6: Sysmex XE abnormal scattergrams observed in our study in the WBC/BASO channel and in the DIFF channel, in *Pv*, *Pm* and *Po* infections



1) *Pv*: abnormal supplementary blue area* under WBCs, in the high side-scatter (SSC) and low FSC range; 2) *Pv*: non-separated neutrophil and eosinophil areas in grey; 3) *Pv*: neutrophil (blue) and eosinophil (red) areas linked (or narrowed space between the two areas); 4) *Pv*: two eosinophil areas and two neutrophil areas; 5) *Pv* and *Po*: two neutrophil areas; 6) *Pm*: eosinophil area abnormally left-shifted. The lower area is cut in two parts by a threshold: the upper one in red is enumerated by the HA as corresponding to eosinophils and the lower one in blue is under the threshold and neglected by the HA

Figure 7: Sysmex XE-2100 and XE-5000 results: WBC counts performed on WBC/BASO and on DIFF channels, and relationship with nature and amount of parasites within blood samples analysed



- 1) Samples infected with *Pf*. Whatever the parasitemia, difference between both WBC counts was low ($-0,2 \pm 0,2$) (the patient with parasitemia $2386 \times 10^9/\text{L}$ is not reported: ΔWBC was 0.07 with this patient);
- 2) Samples infected with other *P*-species. WBC count performed on DIFF channel was found higher than that from WBC/BASO channel, and difference increased with parasitemia

Table III: Reticulocyte parameters and relationship with parasitemia [mean (range)]

Reticulocyte count ($\times 10^9/\text{L}$)	
<i>Pf</i> ($n = 32/35$)*	53 (12 - 151)
Other species ($n = 6$)	55.9 (43 - 79)
IRF (%)	
<i>Pf</i> ($n = 32/35$)*	6.5 (1 - 23)
Other species ($n = 6$)	15.1 (6 - 22)
Reticulocyte/IRF ratio	
<i>Pf</i> : parasitemia 0.2 to $50 \times 10^9/\text{L}$ ($n = 22$)	10.6 (2.7 - 43.3)
<i>Pf</i> : parasitemia 51 to $200 \times 10^9/\text{L}$ ($n = 6$)	22.6 (5.2 - 57.2)
<i>Pf</i> : parasitemia 201 to $2386 \times 10^9/\text{L}$ ($n = 4/7$)*	34.6 (4 - 90.5)
Other <i>P</i> -species: parasitemia 0.1 to $21.3 \times 10^9/\text{L}$ ($n = 6$)	4.2 (2 - 7.6)

* excluding the 3 patients displaying abnormal RET scattergrams

Table IV: Continuous variables of N-OD1_{Pv} and N-OD1_{Pf} models from the present study, and median and accuracy of these models

	<i>Pv: n = 15</i>	<i>Pf: n = 35</i>
PCT (%)	0.1	
WBC[DIFF]/WBC[BASO] ratio	1.1	
LYMPH-Y (arbitrary units)	737	705
RDW-SD (fL)		41.8
PLT-O count ($\times 10^9/L$) (if analysis performed)		82
N-OD1 sensitivity (%)	86.7	77.1

$$N - OD1_{Pv} : \frac{1}{1 + e^{(-74.13 - 20.5PCT + 46WBC[DIFF]/WBC[BASO] + 0.045LYMPH-Y)}} \geq 0.42$$

$$N - OD1_{Pf} : \frac{1}{1 + e^{(-31.024 - 0.018PLT-O + 0.502RDW-SD + 0.019LYMPH-Y)}} \geq 0.29$$

Conclusion

Les analyseurs d'hématologie cellulaire contemporains ne sont pas conçus pour détecter le paludisme. Pourtant, la plupart sont ou seront sans doute en mesure de répondre aux exigences diagnostiques fixées par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (soit une sensibilité de 95% pour un seuil de parasitémie à $0.1 \times 10^9/L$) [59]. Pour cela, il est crucial que, à terme, ces automates génèrent un message qui alerte l'opérateur, lequel sera alors amené à contrôler l'échantillon par les méthodes conventionnelles.

Selon les analyseurs, le diagnostic du paludisme repose, soit sur la détection du parasite intra-érythrocytaire (“diagnostic direct”), soit sur la détection de leucocytes anormaux en rapport avec l’infection (“diagnostic indirect”). Il a été montré qu’au cours d’une infection palustre traitée avec succès, les leucocytes mélanifères peuvent persister dans le sang sur une période prolongée au cours de la convalescence [21]. Ainsi, des automates comme le XE-2100 et le XE-5000 qui détectent directement le parasite présentent deux avantages potentiels: un risque théorique de faux positifs réduit et la possibilité d'estimer la parasitémie et de suivre sa décroissance en cours de traitement. Les analyseurs d'hématologie cellulaire étant désormais utilisés à grande échelle dans les pays non endémiques, le XE à certainement un intérêt pour le diagnostic du paludisme, surtout en l'absence de demande spécifique de la part du prescripteur. Néanmoins, l'analyse en mode optique sur le XE (qui permet d'obtenir les paramètres réticulocytaires et le paramètre PLT-O) reste indispensable pour le dépistage de *Pf*. Dans la mesure où cette analyse n'est pas réalisée systématiquement pour chaque hémogramme, le XE ne peut pas s'intégrer à l'heure actuelle dans une stratégie de dépistage fiable.

Bibliographie

1. WHO: *World malaria report 2012*. Geneva: World Health Organization; 2012.
2. WHO: *International travel and health 2011*. Geneva: World Health Organization; 2011.
3. InVS: **CNR paludisme Rapport d'activités Année 2011**. Institut de Veille Sanitaire; 2012.
4. Singh B, Kim Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, Cox-Singh J, Thomas A, Conway DJ: **A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings**. *Lancet* 2004, **363**:1017-1024.
5. Bannister LH, Sherman IW: *Plasmodium*. John Wiley & Sons, Ltd; 2001.
6. Moody A: **Rapid diagnostic tests for malaria parasites**. *Clin Microbiol Rev* 2002, **15**:66-78.
7. Wilson ML: **Malaria rapid diagnostic tests**. *Clin Infect Dis* 2012, **54**:1637-1641.
8. Newman RD, Parise ME, Barber AM, Steketee RW: **Malaria-related deaths among U.S. travelers, 1963-2001**. *Ann Intern Med* 2004, **141**:547-555.
9. Ohrt C, Purnomo, Sutamihardja MA, Tang D, Kain KC: **Impact of microscopy error on estimates of protective efficacy in malaria-prevention trials**. *J Infect Dis* 2002, **186**:540-546.
10. Mendelow BV, Lyons C, Nhlangothi P, Tana M, Munster M, Wypkema E, Liebowitz L, Marshall L, Scott S, Coetzer TL: **Automated malaria detection by depolarization of laser light**. *Br J Haematol* 1999, **104**:499-503.
11. Kramer B, Grobusch MP, Suttorp N, Neukammer J, Rinneberg H: **Relative frequency of malaria pigment-carrying monocytes of nonimmune and semi-immune patients from flow cytometric depolarized side scatter**. *Cytometry* 2001, **45**:133-140.
12. Grobusch MP, Hanscheid T, Kramer B, Neukammer J, May J, Seybold J, Kun JF, Suttorp N: **Sensitivity of hemozoin detection by automated flow cytometry in non- and semi-immune malaria patients**. *Cytometry B Clin Cytom* 2003, **55**:46-51.
13. Dromigny JA, Jambou R, Scott CS, Perrier-Gros-Claude JD: **Performance evaluation of automated depolarization analysis for detecting clinically unsuspected malaria in endemic countries**. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2005, **99**:430-439.
14. Hanscheid T, Pinto BG, Cristino JM, Grobusch MP: **Malaria diagnosis with the haematology analyser Cell-Dyn 3500: What does the instrument detect?** *Clin Lab Haematol* 2000, **22**:259-261.
15. Fawzi ZO, Fakhro NA, Nabhan RA, Allouche A, Scott CS: **Differences in automated depolarization patterns of Plasmodium falciparum and P. vivax malaria infections defined by the Cell-Dyn CD4000 haematology analyser**. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2003, **97**:71-79.

16. Suh IB, Kim HJ, Kim JY, Lee SW, An SS, Kim WJ, Lim CS: **Evaluation of the Abbott Cell-Dyn 4000 hematology analyzer for detection and therapeutic monitoring of Plasmodium vivax in the Republic of Korea.** *Trop Med Int Health* 2003, **8**:1074-1081.
17. Scott CS, Van Zyl D, Ho E, Ruivo L, Kunz D, Coetzer TL: **Patterns of pseudo-reticulocytosis in malaria: fluorescent analysis with the Cell-Dyn CD4000.** *Clin Lab Haematol* 2002, **24**:15-20.
18. Wever PC, Henskens YM, Kager PA, Dankert J, van Gool T: **Detection of imported malaria with the Cell-Dyn 4000 hematology analyzer.** *J Clin Microbiol* 2002, **40**:4729-4731.
19. Josephine FP, Nissapatorn V: **Malaria: the value of the automated depolarization analysis.** *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2005, **36 Suppl 4**:68-72.
20. Hanscheid T, Melo-Cristino J, Pinto BG: **Automated detection of malaria pigment in white blood cells for the diagnosis of malaria in Portugal.** *Am J Trop Med Hyg* 2001, **64**:290-292.
21. Scott CS, van Zyl D, Ho E, Meyersfeld D, Ruivo L, Mendelow BV, Coetzer TL: **Automated detection of malaria-associated intraleucocytic haemozoin by Cell-Dyn CD4000 depolarization analysis.** *Clin Lab Haematol* 2003, **25**:77-86.
22. Padial MM, Subirats M, Puente S, Lago M, Crespo S, Palacios G, Baquero M: **Sensitivity of laser light depolarization analysis for detection of malaria in blood samples.** *J Med Microbiol* 2005, **54**:449-452.
23. de Langen AJ, van Dillen J, de Witte P, Mucheto S, Nagelkerke N, Kager P: **Automated detection of malaria pigment: feasibility for malaria diagnosing in an area with seasonal malaria in northern Namibia.** *Trop Med Int Health* 2006, **11**:809-816.
24. Hanscheid T, Langin M, Lell B, Potschke M, Oyakhrome S, Kremsner PG, Grobusch MP: **Full blood count and haemozoin-containing leukocytes in children with malaria: diagnostic value and association with disease severity.** *Malar J* 2008, **7**:109.
25. Hanscheid T, Langin M, Codices V, Luty AJ, Adegnika AA, Kremsner PG, Grobusch MP: **Automated detection of haemozoin-containing monocytes for the diagnosis of malaria in microscopically negative cases during pregnancy.** *Acta Trop* 2009, **109**:245-246.
26. Rathod DA, Patel V, Kaur AA, Patel VD, Patel DD: **Diagnosis of acute malaria by laser based cell counter with comparison of conventional and recent techniques in Indian scenario.** *Indian J Pathol Microbiol* 2009, **52**:185-188.
27. Fourcade C, Casbas MJ, Belaouni H, Gonzalez JJ, Garcia PJ, Pepio MA: **Automated detection of malaria by means of the haematology analyser Coulter GEN.S.** *Clin Lab Haematol* 2004, **26**:367-372.
28. Briggs C, Da Costa A, Freeman L, Aucamp I, Ngubeni B, Machin SJ: **Development of an automated malaria discriminant factor using VCS technology.** *Am J Clin Pathol* 2006, **126**:691-698.

29. Kang YH, Lim HS, Lee HM, Lee KS, Choi KM: **[Evaluation of usefulness of the panel test composed of malaria non-specific tests as a surrogate marker].** *Korean J Lab Med* 2008, **28**:332-338.
30. Jean A, Boutet C, Lenormand B, Callat MP, Buchonnet G, Barbay V, Basuyau JP, Vasse M: **The new haematology analyzer DxH 800: an evaluation of the analytical performances and leucocyte flags, comparison with the LH 755.** *Int J Lab Hematol* 2011, **33**:138-145.
31. Lee HK, Kim SI, Chae H, Kim M, Lim J, Oh EJ, Kim Y, Park YJ, Lee W, Han K: **Sensitive detection and accurate monitoring of Plasmodium vivax parasites on routine complete blood count using automatic blood cell analyzer (DxH800(TM)).** *Int J Lab Hematol* 2012, **34**:201-207.
32. Campuzano-Zuluaga G, Hanscheid T, Grobusch MP: **Automated haematology analysis to diagnose malaria.** *Malar J* 2010, **9**:346.
33. Kitua A, Ogundahunsi O, Lines J, Mgone C: **Conquering malaria: enhancing the impact of effective interventions towards elimination in the diverse and changing epidemiology.** *J Glob Infect Dis* 2011, **3**:161-165.
34. Mohapatra S, Samantaray JC, Arulselvi S, Panda J, Munot K, Saxena R: **Automated detection of malaria with haematology analyzer sysmex xe-2100.** *Indian J Med Sci* 2011, **65**:26-31.
35. Campuzano-Zuluaga G, Alvarez-Sanchez G, Escobar-Gallo GE, Valencia-Zuluaga LM, Rios-Orrego AM, Pabon-Vidal A, Miranda-Arboleda AF, Blair-Trujillo S, Campuzano-Mayo G: **Design of malaria diagnostic criteria for the Sysmex XE-2100 hematology analyzer.** *Am J Trop Med Hyg* 2010, **82**:402-411.
36. Huh J, Jung J, Yoon H, Chung W: **Pseudoeosinophilia associated with malaria infection determined in the Sysmex XE-2100 hematology analyzer.** *Ann Hematol* 2005, **84**:400-402.
37. Park GB, Cha YJ: **[Three Cases of Pseudoeosinophilia Associated with Malaria Determined in the Sysmex XE-2100 Automated Hematology Analyzer].** *Korean J Lab Med* 2006, **26**:77-80.
38. Huh HJ, Oh GY, Huh JW, Chae SL: **Malaria detection with the Sysmex XE-2100 hematology analyzer using pseudoeosinophilia and abnormal WBC scattergram.** *Ann Hematol* 2008, **87**:755-759.
39. Yoo JH, Song J, Lee KA, Sun YK, Kim YA, Park TS, Choi JR: **Automated detection of malaria-associated pseudoeosinophilia and abnormal WBC scattergram by the Sysmex XE-2100 hematology analyzer: a clinical study with 1,801 patients and real-time quantitative PCR analysis in vivax malaria-endemic area.** *Am J Trop Med Hyg* 2010, **82**:412-414.
40. Walters J, Garrity P: **Performance Evaluation of the Sysmex XE-2100 Hematology Analyzer.** *Laboratory Hematology* 2000, **6**:83-92.

41. Ruzicka K, Veitl M, Thalhammer-Scherrer R, Schwarzinger I: **The new hematology analyzer Sysmex XE-2100: performance evaluation of a novel white blood cell differential technology.** *Arch Pathol Lab Med* 2001, **125**:391-396.
42. Tanaka C, Nagai T, Nakamura M, Yamauchi Y, Noguchi K, Takimoto Y, Kawabata H, Shigeta H, Murayama T: **Automated Hematology Analyzer XE-5000 - Overview and Basic Performance.** *Sysmex Journal International* 2007, **17**:1-6.
43. Herklotz R, Huber AR: **Precision and Accuracy of the Leukocyte Differential on the Sysmex XE-2100.** *Sysmex Journal International* 2001, **11**:8-21.
44. Sasse EA: **Determination of reference intervals in the clinical laboratory using the proposed guideline National Committee for Clinical Laboratory Standards C28-P.** *Arch Pathol Lab Med* 1992, **116**:710-713.
45. Richards MW, Behrens RH, Doherty JF: **Short report: hematologic changes in acute, imported Plasmodium falciparum malaria.** *Am J Trop Med Hyg* 1998, **59**:859.
46. Robinson P, Jenney AW, Tachado M, Yung A, Manitta J, Taylor K, Biggs BA: **Imported malaria treated in Melbourne, Australia: epidemiology and clinical features in 246 patients.** *J Travel Med* 2001, **8**:76-81.
47. Weatherall DJ, Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK, Casals-Pascual C, Roberts DJ: **Malaria and the red cell.** *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2002:35-57.
48. Mert A, Ozaras R, Tabak F, Bilir M, Ozturk R, Aktuglu Y: **Malaria in Turkey: a review of 33 cases.** *Eur J Epidemiol* 2003, **18**:579-582.
49. Jain M, Kaur M: **Comparative study of microscopic detection methods and haematological changes in malaria.** *Indian J Pathol Microbiol* 2005, **48**:464-467.
50. Lee SW, Jeon K, Jeon BR, Park I: **Rapid diagnosis of vivax malaria by the SD Bioline Malaria Antigen test when thrombocytopenia is present.** *J Clin Microbiol* 2008, **46**:939-942.
51. Lathia TB, Joshi R: **Can hematological parameters discriminate malaria from nonmalarious acute febrile illness in the tropics?** *Indian J Med Sci* 2004, **58**:239-244.
52. Rowan RM, Linssen J: **A Picture is Worth a Thousand Words: XE-2100 and falciparum malaria.** *Sysmex Journal International* 2005, **15**:27-38.
53. Pinter E, Szabo O, Todorova R, Varnai Z, Banhegyi D: **Relapse of Plasmodium vivax and Recrudescence of Plasmodium malariae Malaria, as Detected by the SYSMEX XE-2100 Fully Automated Blood Cell Analyzer.** *Sysmex Journal International* 2007, **17**:102-105.
54. Yan F, Dai Y, Zhang Z, Wan H: **The Correlation of Abnormal Information in Sysmex Hematology Analyzers XE-2100 and XS-1000i with Diagnosis of Plasmodium Infection.** *Sysmex Journal International* 2008, **18**:50-53.
55. Laurencet FM, Martinez T, Beris P: **Spurious extreme reticulocytosis with an automated reticulocyte analyzer.** *N Engl J Med* 1997, **337**:1922-1923.

56. Hoffmann JJ, Pennings JM: **Pseudo-reticulocytosis as a result of malaria parasites.** *Clin Lab Haematol* 1999, **21**:257-260.
57. Zandecki M, Genevieve F, Gerard J, Godon A: **Spurious counts and spurious results on haematology analysers: a review. Part II: white blood cells, red blood cells, haemoglobin, red cell indices and reticulocytes.** *Int J Lab Hematol* 2007, **29**:21-41.
58. de Baca ME, Gulati G, Kocher W, Schwarting R: **Effects of Storage of Blood at Room Temperature on Hematologic Parameters Measured on Sysmex XE-2100.** *LabMedicine* 2006, **37**:28-36.
59. WHO: *The role of laboratory diagnosis to support malaria disease management.* Geneva: World Health Organization; 2006.

Liste des figures

Figure 1: Cycle parasitaire de <i>Pf</i>.....	13
Figure 2: Fenêtres lobularité/granularité de Cell-Dyn 3500.....	16
Figure 3: Fenêtre lobularité/granularité de Cell-Dyn 4000 dans une infection à <i>Pv</i>	16
Figure 4: Fenêtres diffraction/volume de LH 750 avec données positionnelles des sous-populations leucocytaires et formule du “Malaria factor”.....	18
Figure 5: Fenêtres érythroblastes de DxH 800 dans trois infections distinctes à <i>Pv</i>	20
Figure 6: Sysmex XE abnormal scattergrams observed in our study in the WBC/BASO channel and in the DIFF channel, in <i>Pv</i>, <i>Pm</i> and <i>Po</i> infections.....	35
Figure 7: Sysmex XE-2100 and XE-5000 results: WBC counts performed on WBC/BASO and on DIFF channels, and relationship with nature and amount of parasites within blood samples analysed.....	36

Liste des tableaux

Table I: Sysmex XE-2100 and XE-5000 results: RBC, HGB and PLT parameters [mean (range) and (percentage)]	33
Table II: Sysmex XE-2100 and XE-5000 results: automated WBC counts [mean (range)], suspect flags and abnormalities in the DIFF scattergram (percentage)	34
Table III: Reticulocyte parameters and relationship with parasitemia [mean (range)]	37
Table IV: Continuous variables of N-OD1_{Pv} and N-OD1_{Pf} models from the present study, and median and accuracy of these models	38

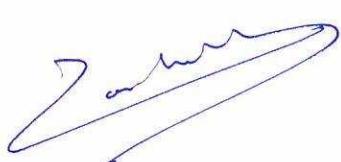
Table des matières

PREAMBULE	12
1. Le paludisme	12
1.1. Définition et épidémiologie	12
1.2. Agent pathogène et cycle parasitaire	12
1.3. Diagnostic	13
1.3.1. Signes d'orientation clinico-biologiques	13
1.3.2. Diagnostic de certitude	14
2. Limites du diagnostic biologique conventionnel	14
3. Place des automates d'hématologie dans l'aide au diagnostic de paludisme	15
3.1. Automates Abbott Cell-Dyn	15
3.1.1. Principes analytiques et anomalies observées au cours du paludisme.....	15
3.1.2. Performances diagnostiques	17
3.2. Automates Coulter Gen.S et LH 750	17
3.2.1. Principes analytiques et anomalies observées au cours du paludisme.....	17
3.2.2. Performances diagnostiques	18
3.3. Automate Coulter DxH 800	19
3.3.1. Principes analytiques et anomalies observées au cours du paludisme.....	19
3.3.2. Performances diagnostiques	20
3.4. Automates Sysmex XE-2100 et XE-5000	20
ARTICLE	21
1. Summary.....	22
2. Introduction.....	22
3. Materials and Methods.....	23
3.1. Samples and reference diagnostic procedures	23
3.2. Data analysis	25
4. Results	25
4.1. Clinical and biological features	25
4.2. Red blood cells, hemoglobin, red cell indices, and platelets (Table I)	25
4.3. White Blood Cell parameters and their relationship with <i>Plasmodium</i> species	26
4.3.1. White Blood Cell scattergrams and comparison between automated and microscopic differentials (Table II).....	26
a) Infection with <i>Plasmodium falciparum</i> (Table II)	26
b) Infection with other <i>Plasmodium</i> species (Table II).....	27
4.3.2. Relationship between White Blood Cell counts and parasitemia	28
4.4. Reticulocyte analysis	28
4.5. Accuracy of diagnostic non-observer dependent models previously developed (N-OD1 _{Pv} and N-OD1 _{Pf})	29
5. Discussion	29
6. Figures and tables	33
CONCLUSION.....	39
BIBLIOGRAPHIE.....	40
LISTE DES FIGURES	45
LISTE DES TABLEAUX.....	46

PERMIS D'IMPRIMER

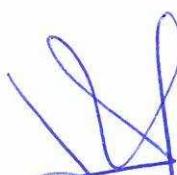
THÈSE DE Monsieur DUBREUIL Philippe

Vu, le Directeur de thèse



René Zandbergen

Vu, le Président du jury de thèse



JP Souchard

Vu, le Doyen de la
Faculté de Médecine
d'ANGERS



Professeur I. RICHARD



Vu et permis d'imprimer

DUBREUIL Philippe

**INTERET DES ANALYSEURS D'HEMATOLOGIE SYSMEX XE-2100 ET XE-5000
POUR LE DIAGNOSTIC DU PALUDISME DANS UN PAYS NON
ENDEMIQUE (FRANCE)**

RESUME

Introduction: Plusieurs analyseurs d'hématologie ont montré des anomalies utiles pour le diagnostic du paludisme. Cependant, la plupart des études publiées ont été menées en zone d'endémie, parfois sans indication des espèces impliquées.

Méthodes: Nous avons étudié rétrospectivement 67 hémogrammes réalisés sur des analyseurs Sysmex XE-2100 et XE-5000 dans notre hôpital (Angers, France). Tous les patients revenaient de zones d'endémie et étaient infectés par diverses espèces de Plasmodium.

Résultats: Dans 83% des échantillons infectés par *P. vivax*, *P. ovale* ou *P. malariae*, des nuages de points anormaux étaient présents dans le canal "differential" (DIFF), au niveau de la zone des polynucléaires neutrophiles et/ou éosinophiles. En revanche, pour *P. falciparum*, le canal DIFF ne présentait aucun changement particulier (0/49 patients). Si l'infection à *P. falciparum* ne pouvait être suspectée lors de l'analyse de routine, les modèles diagnostiques récemment mis au point pour le diagnostic du paludisme à *P. falciparum* dans les pays endémiques se sont révélés performants (sensibilité de 77.1%). L'analyse réticulocytaire a montré que la fraction immature des réticulocytes (IRF) était significativement plus faible dans les échantillons infectés par *P. falciparum* que pour les autres espèces ($6.5 \pm 5.6\%$ vs $15.1 \pm 5.4\%$, $P < 0.05$) et le ratio réticulocytes/IRF était significativement corrélé avec la parasitémie ($r = 0.56$, $IC95\%[0.26-0.77]$, $P < 0.05$).

Conclusion: Les modèles diagnostiques pour *P. falciparum* pourraient être plus performants en intégrant le ratio réticulocytes/IRF, alors que pour les autres espèces, les anomalies du canal DIFF sont suffisantes pour évoquer le diagnostic.

MOTS-CLES

Paludisme

Numération Formule Sanguine

Analyseurs d'hématologie

Sysmex XE-2100

Sysmex XE-5000

FORMAT

Mémoire
 Article¹ : à soumettre soumis accepté pour publication publié
suivi par : Professeur Marc ZANDECKI

¹ statut au moment de la soutenance