

PRATIQUE QUOTIDIENNE

Apport des automates d'hématologie cellulaire dans l'orientation diagnostique du paludisme : à propos d'un cas.

Contribution of hematology analyzers in the diagnostic orientation of malaria: case report.

Hager Zarrouk¹
Hamida Jouini¹
Manel Kaidi¹
Sarra Cheikrouhou²
Assaad Louati³
Rym Dabboubi⁴
Monia Khemiri⁵
Khaled Menif³
Kalthoum kallel²
Taieb ben Messaoud⁴
Nour El Houda Toumi¹

- ¹ Laboratoire Hématologie, Hôpital d'Enfants Béchir Hamza de Tunis, Tunisie.
- ² Laboratoire Parasitologie, Hôpital La Rabta.
- ³ Service Réanimation polyvalente, Hôpital d'Enfants Béchir Hamza de Tunis, Tunisie.
- ⁴ Laboratoire Biochimie, Hôpital d'Enfants Béchir Hamza de Tunis, Tunisie
- ⁵ Service Pédiatrie A, Hôpital d'Enfants Béchir Hamza de Tunis, Tunisie.

Auteur correspondant :

Hager Zarrouk,
Assistante hospitalo-universitaire,

Laboratoire d'hématologie-Hôpital
d'enfants Bechir Hamza

Adresse courriel :

zarroukhager@gmail.com

Résumé

Introduction : Le paludisme est une infection parasitaire grave, ayant une symptomatologie évocatrice dans les régions endémiques. En Tunisie, pays non impaludé, cette parasitose est un défi diagnostique notamment en absence de notion de voyage dans une région endémique.

Notre objectif est de souligner l'apport des scattergrammes fournis par les automates d'hématologie cellulaire dans l'orientation diagnostique du paludisme à travers le cas d'un nourrisson infecté par le *Plasmodium falciparum*.

Présentation du cas : Il s'agit d'un nourrisson de sexe masculin âgé de 2 ans, admis pour prise en charge d'une fièvre prolongée avec hépatosplénomégalie et ayant présenté un épisode de gastroentérite la semaine précédant son hospitalisation. L'hémogramme a révélé une anémie à 58 g/L, normochrome normocytaire régénérative, une thrombopénie à 79 G/L. Le scattergramme des leucocytes du canal « *White Cell Differential* » a montré un nuage additionnel violet au-dessous de celui des polynucléaires éosinophiles. Le scattergramme des réticulocytes a montré une double population des globules rouges. L'examen du frottis sanguin a montré des trophozoïtes et des gamétocytes de *P. falciparum* avec une parasitémie à 6%. Le diagnostic d'une lymphohistiocytose hémophagocytaire secondaire au paludisme a été posé devant la fièvre, la splénomégalie, la bicytopenie, l'hyperferritinémie à 855,4 µg/L et l'hypertriglycéridémie à 6,7 mmol/L.

Conclusion : Bien que l'examen du frottis sanguin et de la goutte épaisse demeurent les méthodes de référence, les scattergrammes fournis par certains automates d'hématologie cellulaire peuvent orienter le diagnostic du paludisme.

Mots-clés : *Plasmodium*, cytométrie de flux, hémozoïne, numération réticulocytaire, lymphohistiocytose hémophagocytaire, analyseur d'hématologie cellulaire, scattergrammes.

Abstract

Introduction : Malaria is a serious parasitic infection, with suggestive symptoms in endemic regions. In Tunisia, a non-malarial country, this parasitosis is a diagnostic challenge, particularly in the absence of any notion of travel to an endemic region.

Our aim is to highlight the contribution of scattergrams provided by hematology analyzers in the diagnostic orientation of malaria through the case of an infant infected with *Plasmodium falciparum*.

Case presentation : A 2-year-old male infant was admitted for management of prolonged fever with hepatosplenomegaly, following an episode of gastroenteritis the previous week. The blood count showed anemia at 58 g/L normochromic normocytic regenerative, thrombocytopenia at 79 G/L. The leukocyte scattergram from the White Cell Differential channel showed an additional purple cloud below that of eosinophils. The reticulocyte scattergram showed a double population of red blood cells. Blood smear examination showed *P. falciparum* trophozoites and gametocytes, with 6% parasitaemia. The diagnosis of lymphohistiocytosis hemophagocytosis secondary to malaria was evoked by the fever, splenomegaly, bicytopenia, hyperferritinemia at 855.4 µg/L and hypertriglyceridemia at 6.7 mmol/L.

Conclusion : Although blood smear and thick drop examination remain the reference methods, scattergrams provided by certain hematology analyzers can guide the diagnosis of malaria.

Key-words : *Plasmodium*, flow cytometry, hemozoin, reticulocyte count, lymphohistiocytosis hemophagocytic, hematology analyzers, scattergrams.

INTRODUCTION

Le paludisme est une infection parasitaire grave potentiellement mortelle due à la piqûre d'un moustique, l'anophèle femelle. Selon l'OMS, 233 millions de cas (94% de l'ensemble des cas mondiaux) ont été rapportés en Afrique, en 2022. Près de 80 % des décès dus à cette maladie dans ce continent concernaient des enfants de moins de cinq ans (1). Bien qu'elle ne soit pas spécifique, la symptomatologie est évocatrice dans les zones endémiques. Au cours d'un accès palustre simple, le patient présente de la fièvre, des maux de tête, des frissons, des signes digestifs, une pâleur et un ictère. Certains cas peuvent évoluer en une forme grave avec des signes neurologiques et une défaillance multiviscérale, rapidement mortelle (2). Dans les pays qui ne sont pas impaludés telle que la Tunisie (3), le paludisme est un challenge diagnostique notamment chez un nourrisson et en absence de notion de voyage.

Nous rapportons le cas d'un nourrisson tunisien âgé de 2 ans présentant une infection à *P. falciparum* évoquée devant les anomalies des scattergrammes de l'automate d'hématologie cellulaire (AHC) Sysmex XN 1500 et confirmée par l'examen du frottis sanguin.

Notre objectif est de souligner l'importance des scattergrammes fournis par les AHC dans l'orientation diagnostique du paludisme.

Présentation du cas

Il s'agit d'un nourrisson de sexe masculin âgé de 2 ans, admis pour prise en charge d'une fièvre prolongée. L'histoire de la maladie remonte à une semaine par l'installation d'une gastro-entérite. A l'admission, le patient était fébrile (38.5 à 40°C), conscient et présentait une hépatosplénomégalie. Le bilan biochimique a montré une protéine C réactive élevée à 67,21 mg/L pour une

valeur normale (VN) <5mg/L, une urée à 6,2 mmol/L (VN= 1,6 - 6,5 mmol/L), une créatinine à 32 µmol/L (VN= 15 - 35 µmol/L), des ASAT discrètement élevées à 110 UI/L (VN < 40 UI/L), des ALAT à 19,7 UI/L (VN <45 UI/L), une bilirubine conjuguée/ totale à 12/35,4 µmol/L (< 4 / < 20 µmol/L), des lactates déshydrogénases augmentées à 606 UI/L (VN = 120 - 300 UI/L), une hyperferritinémie à 855,4 µg/L (VN= 30-300 µg/L), une hypertriglycéridémie à 6,7 mmol/L (VN= 0,35 - 1,45 mmol/L).

L'hémogramme a révélé une anémie à 58 g/L normochrome normocytaire régénérative (réticulocytes= 296,5 G/L), une thrombopénie à 79 G/L et des globules blancs (GB) à 5,240 G/L dont 2,620 G/L polynucléaires neutrophiles (PNN), 2,180 G/L lymphocytes, 0,330 G/L monocytes, 0,01 G/L polynucléaires éosinophiles, 0,01 G/L polynucléaires basophiles et 0,09 G/L précurseurs granulocytaires. Le scattergramme des GB fourni par le canal « *White Cell Differential* » (WDF) (sysmex XN 1500) a montré un nuage additionnel violet en-dessous de celui des polynucléaires éosinophiles (Figure1-a). Quant à celui du canal « *White Nucleated Red Cell* » (WNR), la population additionnelle dans la région des débris, des hématies lysées (en bleu foncé) nécessite un œil aguerri afin d'être mise en évidence (figure1-b). Le scattergramme des réticulocytes a montré une double population des globules rouges (figure1-c) avec une alarme « *reticulocyte abnormal scattergram* ».

L'examen du frottis sanguin a montré des trophozoïtes, des hématies multiparasitées, des gamétocytes de *P. falciparum* avec une parasitémie à 6% (Figure 2-a), des lymphocytes activés (figure 2-b) et de rares PNN mélanifères (figure2-c).

La parasitémie >4% et l'anémie témoignent d'un accès palustre grave (4).

L'association de la fièvre, la splénomégalie, la bicytopenie (anémie, thrombopénie), l'hyperferritinémie et

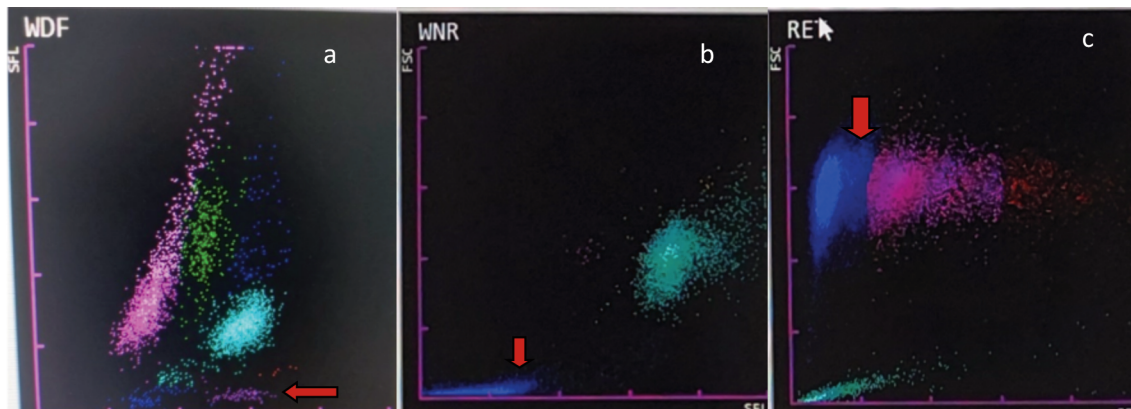


Figure 1 : Scattergrammes fournis par l'automate Sysmex XN 1500 :

- a- celui des globules blancs sur le canal WDF montrant un nuage additionnel en violet,
- b- celui des globules blancs sur le canal WNR, montrant un petit nuage additionnel en bleu foncé,
- c- celui des réticulocytes montrant une double population des globules rouges en bleu.

WDF : *White Cell Differential*, WNR : *White Nucleated Red Cell*, FSC : forward scatter, SFL : side fluorescence light, SSC : side scatter.

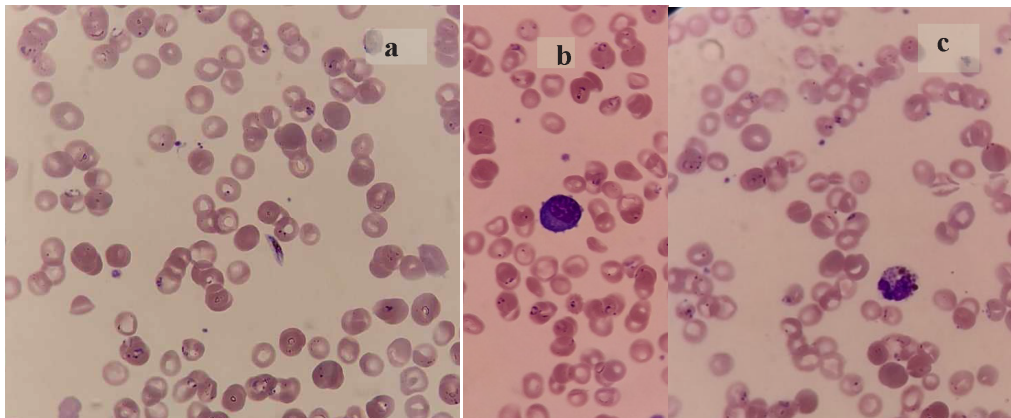


Figure 2 : Frottis sanguin coloré au May Grunwald Giemsa grossissement 10x100 :

a-nombreux trophozoïtes et un gamétocyte de *Plasmodium falciparum*,
 b-Lymphocyte activé(lympho-plasmocyte),
 c-Polynucléaire neutrophile mélanifère

l'hypertriglycéridémie (5 parmi les 8 critères de la lymphohistiocytose hémophagocytaire (LHH)) pourraient évoquer le diagnostic d'une LHH compliquant un paludisme à *P. falciparum* (5). Le nourrisson a été transféré en urgence au service de réanimation où il a reçu l'artésunate IV (3mg/kg à H0, H12, H24 puis chaque 24H pendant 4 jours) et une transfusion de concentré érythrocytaire. Au bout de quatre jours, l'artémether-luméfantine par voie orale ont été administrés. L'évolution était favorable avec apyrexie.

L'enquête entomologique réalisée autour du cas était négative. Aucun antécédent transfusionnel, ni notion de voyage récent (dans les six derniers mois) n'ont été rapportés. Cependant, la notion de passage de l'enfant par un aéroport international (voyage en Turquie depuis un an) a permis de conclure à un paludisme des aéroports.

DISCUSSION

L'hémogramme est l'un des examens les plus demandés dès l'admission des patients aux urgences ou aux services cliniques. Au bout de quelques minutes, le résultat est disponible avec des scattergrammes qui sont d'un apport considérable aussi bien dans la validation biologique que dans l'orientation diagnostique. En effet, ce cas illustre la contribution des scattergrammes des GB et des réticulocytes dans l'orientation diagnostique du paludisme qui constitue une urgence vitale.

Les acides nucléiques contenus dans le noyau des parasites fixent les fluorochromes utilisés en cytométrie en flux (un des principes de fonctionnement des AHC), émettant une fluorescence supplémentaire observable sur les scattergrammes (2).

Le nuage additionnel observé dans le scattergramme du canal WDF chez notre patient correspondrait aux rares gamétocytes observés sur le frottis sanguin. En effet, Buoro et al. (6), ont montré que les altérations des scattergrammes des GB sont plus fréquemment observés en présence de gamétocytes et de schizontes. D'après les auteurs, le nuage additionnel pourrait être dû à la présence du parasite aux stades de gamétocytes et de schi-

zontes mais aussi à la présence simultanée de cristaux d'hémozoïne (6). L'hémozoïne ou le pigment malarique provient de la dégradation de l'hémoglobine par le parasite (7). Il peut être retrouvé dans les hématies ou dans le cytoplasme des leucocytes, appelés alors « leucocytes mélanifères » (7). L'hémozoïne peut être de couleur brun-doré (comme le PNN mélanifère de la figure 2-c), parfois presque noir, de taille et de forme variables, sous forme de grain unique ou de multiples granulations intracytoplasmiques (7). Dans le cas de ce patient, la présence de gamétocytes et de PNN mélanifères pourrait être à l'origine du nuage additionnel observé dans le scattergramme du canal WDF (6). La détection des PNN mélanifères sur le scattergramme du canal WDF serait d'un apport considérable dans l'orientation diagnostique du paludisme. Elle contribuerait aussi au suivi et à l'évaluation pronostique de cette infection potentiellement mortelle (6,8,9). En effet, les PNN mélanifères sont associés à la sévérité et à la mortalité au cours du paludisme grave (6,7).

Certains AHC tel que le sysmex XN-10 (IPU V.21.12) fournissent une alarme « parasitic red blood cell » (*prRBC*) grâce au canal WDF, correspondant aux GR parasités. La prévalence de cet indicateur dans la population testée pour le paludisme était de 1,027 % contre 0,026 % dans l'ensemble de la population. La sensibilité, la spécificité et les valeurs prédictives positives et négatives de l'indicateur *prRBC* étaient respectivement de 7,8 %, 100 %, 100 % et 87,7 % (9).

Dumas et al. (9,10), ont montré que les populations anormales décrites sur les scattergrammes WDF et WNR sont absentes lorsque seuls des trophozoïtes sont retrouvés dans le sang périphérique, même avec une parasitémie élevée. Les trophozoïtes intra-érythrocytaires, dont l'aspect en forme de bague à chaton est caractéristique de *P falciparum*, interfèrent plutôt au niveau du scattergramme des réticulocytes (2,6,10). Dans le cas de ce patient, une double population des globules rouges matures est apparue dans le graphe des réticulocytes (figure 1-c) avec une alarme « *reticulocyte*

abnormal scattergram ». La double population correspond aux hématies saines (en bleu à gauche -figure 1-c) et à celles parasitées (en bleu entre les hématies saines et les réticulocytes de faible fluorescence-figure 1-c) (2). Cette anomalie serait plus fréquente avec le *P. falciparum*, caractérisé par un multiparasitisme (6). En effet, la double population des hématies serait en rapport avec le multiparasitisme plutôt que la parasitémie. Dans le présent cas, une double population d'hématies a été observée avec une parasitémie à 6%, contrairement à d'autres cas décrits dans la littérature ayant une parasitémie plus élevée (2). Les trophozoïtes de *P. falciparum* contenant une petite quantité d'ARN, émettent une fluorescence similaire à celle des réticulocytes de faible fluorescence expliquant ainsi les anomalies du décompte des réticulocytes (2,6,10). Par conséquent, une surestimation de la fraction immature de ces derniers ainsi qu'une alarme « *reticulocyte abnormal scattergram* » sont souvent présentes en cas d'infection à *P. falciparum* mais absentes au cours des infections à *P. vivax* et à *P. ovale* (6). En effet, le type d'hématies parasitées dépend de l'espèce. *P. falciparum* et *P. knowlesi* infectent tous les types de globules rouges, *P. vivax* et *P. ovale* les réticulocytes et *P. malariae* les hématies anciennes (2). Par ailleurs, les stades parasitaires rencontrés sont différents selon l'espèce de *Plasmodium*. Les trophozoïtes, avec ou sans gamétocytes, sont les seuls stades présents lors de l'infection à *P. falciparum*, tandis que tous les stades peuvent être rencontrés avec les autres espèces (2,6). Ainsi, le scattergramme des réticulocytes sera impacté différemment en fonction de l'espèce (taille et fluorescence émise différentes) (2,6).

Par ailleurs, le nourrisson a présenté un tableau biologique évoquant une LHH. La LHH est une entité rare et grave. La mortalité associée peut atteindre jusqu'à 22% chez les enfants. On distingue la LHH primaire, familiale

et la LHH secondaire à diverses pathologies dont les infections graves, en particulier virales (5). Exceptionnellement, l'infection paludéenne a été incriminée dans la survenue d'une LHH (5). L'association des deux maladies est probablement sous-estimée car leurs manifestations cliniques et biologiques se chevauchent. Le diagnostic de la LHH est retenu devant la présence de cinq parmi les huit critères suivants : la fièvre, la splénomégalie, la bicytopenie ou la pancytopenie (hémoglobine < 90 ou 10 g/L chez les nouveau-nés âgés de moins de 4 semaines, plaquettes < 100 G/L, PNN < 1 G/L), l'hypertriglycéridémie ≥ 3 mmol/L et/ou l'hypofibrinogénémié $\leq 1,5$ g/L, l'image d'hémophagocytose, l'hyperferritinémie ≥ 500 $\mu\text{g/L}$, les CD25 solubles ≥ 2400 U/ml et l'activité NK diminuée ou absente. Il est à noter que les images d'hémophagocytose ne sont observées que chez 43 à 95% des patients diagnostiqués avec une LHH. En outre, ces images ne sont pas pathognomoniques de cette entité puisqu'on peut les observer au cours des infections, des maladies auto-immunes, des insuffisances médullaires et en post transfusionnel. Ces images d'hémophagocytose ne sont ni nécessaires, ni suffisantes pour poser le diagnostic d'une LHH (5).

CONCLUSION

Le paludisme à *P. falciparum* est une maladie tropicale grave, à déclaration obligatoire et qui n'existe pas en Tunisie. Cependant, les biologistes peuvent être confrontés à des cas d'importation ou survenant à la suite de piqûres d'anophèles importés. Bien que l'examen du frottis sanguin et de la goutte épaisse demeurent les méthodes de référence, les scattergrammes fournis par certains AHC peuvent orienter le diagnostic du paludisme. L'association du paludisme avec la LHH est rarement décrite à cause de la grande similitude entre les signes clinico-biologiques des deux entités.

REFERENCES

1. World malaria report 2023 n.d. <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2023> (accessed March 24, 2024).
2. Pitti P, Tassin F, Keutgens A. Contribution of hematology analyzers (Sysmex XN-Series) in the rapid diagnosis of malaria: case reports. *Annales de Biologie Clinique* 2023;00:00–00. <https://doi.org/10.1684/abc.2023.1791>.
3. Pays et territoires certifiés exempts de paludisme n.d. <https://www.who.int/fr/teams/global-malaria-programme/elimination/countries-and-territories-certified-malaria-free-by-who> (accessed March 24, 2024).
4. Recommandations Paludisme : traitement. VIDAL n.d. <https://www.vidal.fr/maladies/recommandations/paludisme-traitement-1845.html> (accessed March 24, 2024).
5. Griffin G, Sheno S, Hughes GC. Hemophagocytic lymphohistiocytosis: An update on pathogenesis, diagnosis, and therapy. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 2020;34:101515. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2020.101515>.
6. Buoro S, Manenti B, Seghezzi M, Moioli V, Bagorria M, Callegaro A, et al. Abnormal scattergrams and cell population data generated by fully automated hematological analyzers: New tools for screening malaria infection? *Int J Lab Hematology* 2018;40:326–34. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12790>.
7. Balédent F, Vergé V. Découverte fortuite d'une infection à *Plasmodium falciparum*. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 2010;25:62–5. <https://doi.org/10.1016/j.immbio.2009.10.001>.
8. Campuzano-Zuluaga G, Alvarez-Sánchez G, Escobar-Gallo GE, Valencia-Zuluaga LM, Ríos-Orrego AM, Pabón-Vidal A, et al. Design of malaria diagnostic criteria for the Sysmex XE-2100 hematology analyzer. *Am J Trop Med Hyg* 2010;82:402–11. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0464>.
9. Dumas C, Tirard-Collet P, Mestrallet F, Girard S, Jallades L, Picot S, et al. Flagging performance of Sysmex XN-10 haematology analyser for malaria detection. *J Clin Pathol* 2020;73:676–7. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2019-206382>.
10. Dumas C, Bienvenu A-L, Girard S, Picot S, Debize G, Durand B. Automated *Plasmodium* detection by the Sysmex XN hematology analyzer. *J Clin Pathol* 2018;71:594–9. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2017-204878>.