

## Revisión

### El paludismo y las pruebas rápidas de diagnóstico

Hilda A Pérez\*, Carmen Bracho & Mercedes De La Rosa

Las pruebas rápidas para el diagnóstico de la malaria surgieron en los noventa con miras a proporcionarle a la microscopía un adjunto fiable en el escenario clínico y epidemiológico, utilizan principios de inmunocromatografía de flujo lateral y pretenden tipificar a la especie de *Plasmodium* según la pesquisa de productos antigénicos secretados por los estadios eritrocíticos. Resultan sencillas en su ejecución, expeditas, sensibles y no precisan microscopio; los primeros formatos identificaban únicamente a *Plasmodium falciparum*, posteriormente agregaron la posibilidad de distinguir infecciones por plasmodios otros que *falciparum*. Las dianas antigénicas más aprovechadas han sido la proteína 2 rica en histidina de *P. falciparum* y las enzimas deshidrogenasa láctica y aldolasa de *Plasmodium* sp. Los alegatos en contra señalan poca sensibilidad frente a las parasitemias bajas, falsos positivos, falsos negativos junto a la imposibilidad de diagnosticar a las infecciones mixtas, reconocer a *Plasmodium vivax* y cuantificar las parasitemias. Se discute el desempeño de las pruebas rápidas para el diagnóstico de la malaria durante su aplicación en zonas endémicas, evolución de sus prototipos, pertinencia a la mejora del diagnóstico, relación costo/beneficio y utilidad en el seguimiento de la respuesta terapéutica.

**Palabras claves:** malaria, diagnóstico, PfHRP-2, pLDH, p-aldolasa.

#### INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la malaria o paludismo provoca anualmente entre 350 y 500 millones de casos clínicos y más de un millón de defunciones (WHO, 2005). Sin embargo, algunos especialistas consideran que estas cifras apenas si reflejan el inmenso agobio que a causa de esta enfermedad sufre la humanidad. La cuantificación del número global de casos clínicos resulta muy difícil porque la mayoría de los países endémicos enfrenta dificultades con sus estadísticas sanitarias, en muchas zonas endémicas la población no tiene acceso al diagnóstico parasitológico, los residentes en zonas de transmisión muestran parasitemia en cualquier momento y los párvulos suelen padecer anualmente hasta nueve o más episodios febriles

(Breman, 2001). Además y no menos importante, porque las cifras relativas a morbilidad y mortalidad atribuidas directamente a paludismo desconocen otras consecuencias de la enfermedad como son: la anemia crónica, la deficiencia de peso al nacer, la mayor vulnerabilidad a las enfermedades de la niñez, la mortalidad peri-natal, el retraso en el desarrollo, la sub-nutrición y las secuelas neurológicas y cognitivas provocadas por el paludismo (Breman *et al.*, 2004).

Actualmente, cerca de 3,2 billones de personas habitan territorios donde se arriesgan a contraer paludismo (Hay *et al.*, 2004). La enfermedad se relaciona con cuatro especies del género *Plasmodium*: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium ovale*. Las dos primeras tienen la mayor incidencia y entre todas, *falciparum* es la más peligrosa, por su relación con episodios severos y mortales, por la dispersión mundial de sus estirpes resistentes a las drogas antipalúdicas y por su predominio en África, el continente con mayor incidencia palúdica.

Laboratorio de Inmunoparasitología, Centro de Microbiología y Biología Celular, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, IVIC, Apartado 21827, Caracas 1020 A, Venezuela.

\*Autor de correspondencia: hperez@ivic.ve

*Plasmodium falciparum* predomina en los climas cálidos y lluviosos mientras que *P. vivax* despliega una extensa cobertura geográfica en regiones tropicales, subtropicales y hasta en algunas templadas. En cuanto a *P. malariae* y *P. ovale*, el primero se muestra irregular en el trópico y ovale esporádico en África, América del Sur y algunos países del Lejano Oriente (Bruce-Chwatt, 1986).

La estrategia global de control de paludismo auspiciada por la OMS (WHO, 1993) y acogida por la mayoría de los países endémicos, anticipa el diagnóstico oportuno a la instauración del tratamiento anti-palúdico. Desafortunadamente, en muchas zonas endémicas la infraestructura adecuada al diagnóstico microscópico no existe o es precaria y ante el riesgo de una malaria complicada, los pacientes son tratados conforme al diagnóstico clínico. Tan sólo en África se estima que ocurren 4,9 billones de eventos febriles o de tratamientos anti-palúdicos, cifras que por sí solas indican la necesidad de pruebas de diagnóstico fiables, rápidas, sencillas y económicas que permitan asistir a los pacientes, ayuden a conservar drogas valiosas y contribuyan a prevenir la irrupción y expansión de los parásitos resistentes (Breman *et al.*, 2004). Especialmente porque la expansión de los parásitos multi-resistentes ha motivado cambios en las políticas de tratamiento anti-palúdico, hacia esquemas más costosos basados en la terapia combinada con artemisinina (WHO, 2005).

Durante muchos años, el examen microscópico convencional de los frotis de sangre teñidos con colorante de Giemsa en sus modalidades de gota gruesa (GG) y extendido, ha sido la técnica más fiable y barata para diagnosticar al paludismo. Aunque la prueba es técnicamente sencilla y sus costos directos son relativamente bajos, requiere de microscopistas bien capacitados en la coloración y discriminación morfológica de los parásitos, una infraestructura adecuada de mantenimiento de insumos y equipos, además de control periódico de la calidad de los procesos y de la eficiencia de los microscopistas. Consecuentemente, en muchas regiones endémicas y por una variedad de razones operacionales, el diagnóstico microscópico efectuado en los servicios periféricos de salud no alcanza la fiabilidad y calidad apropiadas (Aron, 1982; Barat *et al.*, 1999; Gautam *et al.*, 1992; Kachur *et al.*, 1995; Cáceres *et al.*, 2006), problemas que en la práctica desfavorecen la diligencia de las acciones de control.

Las dificultades relacionadas con el diagnóstico del paludismo no son exclusivas de los países pobres y con transmisión de la enfermedad, hoy por hoy, dados los desplazamientos humanos entre regiones endémicas y no endémicas, los países desarrollados también confrontan equívocos con el diagnóstico y atención de los pacientes palúdicos, infectados allende los mares. Kain *et al.* (1998) refieren que en Canadá, más de 50% de los casos de malaria importada no suscitó sospecha de malaria durante la primera visita al centro de salud y 16% requirió de al menos tres visitas médicas, antes que se ordenara el examen de un frotis de sangre. Datos retrospectivos sobre los problemas relacionados con el diagnóstico de malaria en Canadá y Estados Unidos, señalaron que fuera de los laboratorios especializados, las pruebas son poco confiables y ante la referencia de casos sospechosos, los frotis no fueron examinados con la urgencia del caso y tampoco se informó rutinariamente de la especie y nivel de parasitemia (Kain *et al.*, 1998). Cuando la identificación de la especie fue profesional, hubo tendencia a sobrestimar a las infecciones por *P. falciparum*, acarreado el uso innecesario de anti-palúdicos de segunda y tercera línea aplicados al tratamiento de infecciones por *P. vivax*, además de no utilizar primaquina en prevención de las recaídas. En países con alto nivel de desarrollo, las demoras en el diagnóstico y tratamiento de la malaria importada se relacionaron con 0,6% a 3,8% de defunciones por *falciparum* (Greenberg & Lobel, 1990) y 20% de casos de malaria severa, incluso cuando fueron atendidos en una unidad moderna de terapia intensiva (Campbell, 1991). Por consiguiente, aun aquellos que disfrutaban de un sistema de salud adelantado y sofisticado, se han visto expuestos a complicaciones y hasta defunciones por paludismo, derivadas del reconocimiento tardío de la infección, inexactitudes del diagnóstico de laboratorio y fallas en la instauración de terapia oportuna (Greenberg & Lobel, 1990).

Los intentos por mejorar la cobertura y la eficacia del diagnóstico, han promovido el desarrollo de métodos alternativos con opciones que trajinan las tinciones con colorantes fluorescentes (Kawamoto, 1991; Rickman *et al.*, 1989), la detección inmunológica de antígenos específicos (Shiff *et al.*, 1993) y la pesquisa de la impronta genética por métodos de biología molecular (Snouno *et al.*, 1993; Singh *et al.*, 1999; Greenwood, 2002; Berry *et al.*, 2005). Entre las tinciones fluorescentes,

la mayor experiencia se tiene con la naranja de acridina (NA) (Kawamoto, 1991) y con el sistema de QBC (Quantitative Buffy Coat System™, Becton Dickinson) descrito por Rickman *et al.*, (1989). En este último, los eritrocitos parasitados y teñidos con NA, son concentrados y estratificados en un capilar, para ser luego examinados bajo microscopio de epifluorescencia. El ensayo es un procedimiento rápido y fácil de aprender, ha sido evaluado en varios estudios de campo (Lowe *et al.*, 1996; Bosch *et al.*, 1996) con resultados de sensibilidad y especificidad, satisfactorios a la pesquisa del paludismo por *falciparum*. Los eritrocitos infectados con los estadios jóvenes y gametocitos de este parásito se distinguen con facilidad, mayores problemas se tienen con *P. vivax*, cuyos trofozoitos maduros tienden a estratificar entre las células mononucleares donde pueden resultar difíciles de distinguir (Bosch *et al.*, 1996).

El rastreo de la huella genética del parásito, con ensayos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ofrece alta especificidad y sensibilidad. Particularmente, un ensayo de PCR adecuado a la detección del ADN genómico de las cuatro especies parasitarias, muy sensible (<1 parásito/μL de sangre) y eficaz en la pesquisa de infecciones mixtas (Snouno *et al.*, 1993; Postigo *et al.*, 1998, Singh *et al.*, 1999). Sin embargo, por una variedad de razones técnicas y presupuestarias, los ensayos basados en la reacción de PCR no son fáciles de incorporar a la rutina de diagnóstico de los países endémicos.

Esta breve revisión dispensará atención especial a la pesquisa del paludismo, con las llamadas pruebas rápidas de diagnóstico de malaria (PRDM). A los aciertos y desaciertos señalados durante su aplicación en zonas endémicas y a las expectativas relevantes al mejoramiento del diagnóstico y a la evaluación de la respuesta al tratamiento anti-palúdico.

#### LAS PRUEBAS RÁPIDAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE MALARIA (PRDM)

Las PRDM surgieron en los noventa con miras a proporcionarle a la microscopía un adjunto fiable en el escenario clínico y epidemiológico, utilizan principios de inmunocromatografía incorporados a formatos de cintas reactivas o de

tarjetas de prueba y pretenden tipificar a la especie de *Plasmodium* conforme a la detección de antígenos específicos producidos por el parásito. El diseño de las PRDM atiende con especial propósito, la sencillez de ejecución, el manejo a temperatura ambiente sin auxilio de instrumentos y la rapidez del diagnóstico en sólo 10 a 15 minutos. Las primeras, estuvieron destinadas a identificar únicamente a *P. falciparum*, posteriormente surgieron las que agregaron la posibilidad de distinguir infecciones por plasmodios otros que *falciparum*. Las dianas antigénicas más aprovechadas han sido la proteína 2 rica en histidina de *P. falciparum* (PfHRP-2) y las enzimas deshidrogenasa láctica (pDHL) y aldolasa de los parásitos *Plasmodium*. Generalmente, el antígeno presente en la sangre infectada y previamente tratada con un detergente no iónico, es capturado por un anticuerpo monoclonal (Ac. Mon) inmovilizado sobre un soporte sólido, normalmente una matriz de celulosa. Seguidamente esta reacción deviene revelada por otro Ac. Mon o un anticuerpo policlonal mono-específico conjugado a un marcador coloreado e insoluble en medio acuoso, lo que da lugar a una impronta coloreada sobre el sitio de reacción.

#### Las PRDM fundamentadas en la PfHRP-2 de Plasmodium falciparum

Entre las primeras encontramos a ParaSight-F (Shiff *et al.*, 1993; Beadle *et al.*, 1994), diseñada con la finalidad de revelar específicamente a PfHRP-2. Esta proteína, exclusiva de *P. falciparum* y relativamente bien conservada entre sus linajes, deviene secretada activamente por los estadios asexuales y los gametocitos inmaduros. PfHRP-2 posee un alto contenido de histidina (H) (34%), alanina (A) (37%) y ácido aspártico (D) (10%) y muchas subunidades repetidas ricas en histidina y alanina, tales AHH y AHHAAD (Panton *et al.*, 1989), sus funciones fisiológicas no están definidas, posiblemente participa en la formación de la hemozoina (Sullivan *et al.*, 1996; Schneider & Marletta, 2005). Transcurridos unos 13 años de la introducción de la primera PRDM basada en la PfHRP-2, se han comercializado más de una veintena de nuevas versiones basadas en el mismo principio. Las denominaciones ParaSight-F e ICT-malaria-P.f han sido bastante estudiadas en las zonas endémicas de malaria, con resultados que avalan desempeños de sensibilidad y especificidad útiles a la clínica (Banchongaksorn *et al.*, 1997;

Beadle *et al.*, 1994; Caraballo & Ache, 1996; Craig & Sharp, 1997; Cropley *et al.*, 2000; Forney *et al.*, 2001; Gaye *et al.*, 1998; Humar *et al.*, 1997; Lema *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 1997; Valecha *et al.*, 1998). Los problemas más importantes se han relacionado con: a) falsos negativos en individuos cuyas parasitemias eran inferiores a 500 parásitos/ $\mu$ L de sangre (Beadle *et al.*, 1994; Shiff *et al.*, 1993; Uguen *et al.*, 1995); b) falsos positivos causados por interferencias del factor reumatoide (Grobusch *et al.*, 1999; Iqbal *et al.*, 2003) y c) falsos positivos en individuos infectados y tratados exitosamente.

Los falsos positivos post-tratamiento y sin evidencia de falla terapéutica, posiblemente se deban a que PfHRP-2 puede hallarse en sangre periférica hasta dos semanas después de la extinción terapéutica de los parásitos asexuales (Karbwang *et al.*, 1996; Vakharia *et al.*, 1997). Adicionalmente PfHRP-2 también es sintetizada por los gametocitos inmaduros, los cuales sobreviven a la mayoría de esquizonticidas (Hayward *et al.*, 2000). Por estas razones, la pesquisa de PfHRP-2 puede introducir equívocos en la interpretación de la eficacia de los tratamientos anti-palúdicos (Mayxay *et al.*, 2001b; Tjitra *et al.*, 2001a; 2001b).

Bajo otras circunstancias, las PRDM basadas en PfHRP-2 tienen la ventaja potencial de discriminar a *falciparum* en los sujetos portadores de parasitemias sub-microscópicas en sangre periférica, pero secuestradas en el lecho vascular, tal el secuestro placentario del parásito (Leke *et al.*, 1999) o en las asociaciones crípticas de *falciparum* con *P. vivax* (Mayxay *et al.*, 2001a).

Los informes de falsos negativos en individuos con diagnóstico microscópico de *falciparum* resultan difíciles de conciliar, la mayoría alude a parasitemias bajas con umbral que sitúan entre 100 y 500 parásitos/ $\mu$ L, mientras una minoría apunta parasitemias altas con resultados negativos (Forney *et al.*, 2003; Wongsrichanalai *et al.*, 1999). A las variaciones en los lotes del producto, deterioro de los reactivos causado por las condiciones ambientales o manejo inapropiado de la prueba, se añaden, posiblemente, factores más complejos. Por ejemplo se ha informado que algunos linajes de *P. falciparum* carecen del gen *pfhrp-2* (Uguen *et al.*, 1995) y recientemente Baker *et al.*, (2005) hallaron diversidad genética del gen *pfhrp-2* en muestras silvestres de *P.*

*falciparum* provenientes de África, Asia y América del Sur. De 14 arreglos repetidos de aa identificados en PfHRP-2, cinco solamente fueron comunes a todos los aislados estudiados. A mayor número de arreglos repetidos, especialmente con las secuencias AHHAHHAAD Y AHHAAD, mayor la probabilidad de un resultado positivo a parasitemias de baja densidad (250 parásitos/ $\mu$ L). Los autores argumentaron que este polimorfismo posiblemente es relevante a la especificidad fina de los anticuerpos incorporados en las PRDM basadas en PfHRP-2 y en consecuencia a la sensibilidad de la prueba (Baker *et al.*, 2005). Un estudio reciente (Lee *et al.*, 2006a) ha explorado la reactividad de varios anticuerpos monoclonales (Ac. Mons) específicos de PfHRP2 frente a muestras de *P. falciparum* procedente de varias zonas geográficas y ha determinado los epitopos reconocidos por estos Ac. Mons y relación de su reactividad según el número de copias de los epitopos, comprobando que los Ac. Mons reaccionaban distintamente según se tratara de un mismo anticuerpo con varias muestras silvestres o viceversa. Las secuencias identificadas para los epitopos de tres de los Ac. Mons se encontraron con frecuencia variable entre linajes silvestres de *P. falciparum* (Lee *et al.*, 2006a).

Los hallazgos señalados anteriormente (Baker *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006a) demuestran que aun sutiles variaciones en la secuencia y frecuencia de los epitopos relacionados con la especificidad de los Ac. Mons empleados en las PRDM, pueden ser relevantes a la sensibilidad del ensayo.

*Las PRDM que combinan PfHRP-2 y un antígeno genérico de Plasmodium sp.*

A las PRDM basadas en PfHRP-2 únicamente, sucedieron las que agregaron la posibilidad de diagnosticar paludismo por otras especies de *Plasmodium* distintas de *falciparum*, aunque sin exclusión precisa de su identidad (Iqbal *et al.*, 2001; 1999; Singh *et al.*, 2000; 1997; Tjitra *et al.*, 1999). Se trata de identificar antígenos comunes a las cuatro especies que infectan al humano, cual la aldolasa de *Plasmodium* (p-aldolasa) (Cloonan *et al.*, 2001). Bajo la modalidad mencionada, la p-aldolasa actúa en calidad de antígeno genérico y señala infección por *Plasmodium sp.*, mientras PfHRP-2 revela específicamente a *falciparum*. Una de las versiones de esta aproximación es ICT malaria Pf/Pv, cuyo desempeño de sensibilidad se ha reportado

relativamente aceptable en las infecciones por *P. falciparum* y poco fiable en las mono-infecciones por *P. vivax* u otros plasmodios (Tjitra *et al.*, 1999; Coleman *et al.*, 2002; Richter *et al.*, 2004). Estas diferencias, al parecer, no se vinculan a que exista diversidad entre la aldolasa de *P. falciparum* y de *P. vivax*, pues la secuenciación de los genes codantes respectivos en linajes silvestres de diferentes orígenes indicó alto grado de conservación (Lee *et al.*, 2006b). La p-aldolasa comparte con PfHRP-2 la persistencia en sangre periférica aun después de la eliminación de la parasitemia asexual, especialmente por *falciparum*, un hecho a tener en consideración al utilizar PRDM basadas en el rastreo de p-aldolasa, durante el seguimiento post-tratamiento (Tjitra *et al.*, 2001a; 2001b; Iqbal *et al.*, 2004).

Un intento por lograr una PRDM cuya sensibilidad y especificidad resultaran aceptables a la pesquisa de las infecciones por *falciparum* y *vivax*, fue ParaSight F\_V, modalidad del ParaSight-F que al anticuerpo anti-PfHRP-2 añadió otro específico de un antígeno de *P. vivax*, sirviendo a la causa de identificar ambas especies en una sola cinta. Evaluado en 1999 en zonas endémicas de Perú y Tailandia, se lo encontró muy sensible en las infecciones por *falciparum* con parasitemias superiores a 500 parásitos/ $\mu$ L, con un descenso de la sensibilidad en aquellas de menor densidad, y de desempeño menos satisfactorio en las infecciones por *P. vivax* (Forney *et al.*, 2003).

#### *Las PRDM fundamentadas en la pLDH de Plasmodium*

Se basan en la detección inmunológica de las isoformas de la pLDH, una enzima producida por los parásitos vivos y descrita a principios de los sesenta en *Plasmodium lophurae* (Sherman, 1961). Entre las primeras PRDM con este principio se encuentra OptiMAL®, que utilizó un Ac. Mon específico de la isoforma de pLDH (17E4) de *P. falciparum* y dos genéricos (6C9 y 19G7) reactivos con todas las isoformas de pLDH, el 6C9 conjugado a oro coloidal (Palmer *et al.*, 1998; Piper *et al.*, 1999). Sirviendo los anticuerpos 17E4 y 19G7 a las capturas del antígeno y el conjugado 6C9-oro coloidal a la detección dichas capturas. Dos improntas coloreadas señalan una infección por *P. falciparum*, correspondientes a los anticuerpos 17E4 y 19G7, específico y genérico, respectivamente. Si se trata de una infección con cualquier otro *Plasmodium*, será visible únicamente la

señal provista por el Ac. Mon 19G7. En la práctica, la incorporación de un anticuerpo anti-inmunoglobulinas murinas añade una tercera impronta indicadora de la presencia e idoneidad del anticuerpo detector. Criterio diagnóstico es la formación de tres bandas coloreadas en el caso de las infecciones por *P. falciparum* y sólo dos, con cualquier otro *Plasmodium*. Dado que la pLDH, diferente de PfHRP-2, es una enzima producida sólo por los parásitos vivos, su hallazgo presume una infección activa. Sin embargo, la PfLDH también es producida por los gametocitos y en el caso de parasitemias conformadas exclusivamente por gametocitos, por ejemplo tras la quimioterapia con drogas que sólo actúan sobre los estadios asexuales, tienen el potencial de producir reacciones positivas y con ello equívocos sobre la eficacia terapéutica (Oduola *et al.*, 1997).

En cuanto a la sensibilidad, el ensayo basado en la búsqueda de la PfLDH y comercializado con el nombre de OptiMAL® detecta infecciones con parasitemias hasta de 200 parásitos/ $\mu$ L de sangre, se lo ha evaluado en varios países con transmisión de malaria con resultados que atestiguan, buen desempeño frente a las infecciones con *P. falciparum* y menos exitoso en aquellas por *P. vivax*. Las referencias a la sensibilidad de OptiMAL® son controversiales y algunos autores basados en el hallazgo de indicadores razonables de sensibilidad y especificidad, la consideran útil cuando las facilidades laboratoriales son inexistentes, escasas o poco confiables (Moody *et al.*, 2000) mientras que otros, alegando baja sensibilidad se muestran cautelosos en recomendarla aunque reconocen sus ventajas bajo una serie de circunstancias (Fryauff *et al.*, 2000; Huong *et al.*, 2002; Mason *et al.*, 2002; Kolaczinski *et al.*, 2004). Las experiencias realizadas en Venezuela, son coincidentes en cuanto a la baja sensibilidad de OptiMAL® frente a las parasitemias de *P. vivax* menores de 500 parásitos/ $\mu$ L (De Abreu *et al.*, 2001).

OptiMAL® ha sido reconfigurada con otras generaciones de mayor estabilidad a las condiciones ambientales adversas (Moody & Chiodini, 2002; Penhalbel *et al.*, 2005). Aunque han persistido los cuestionamientos a la sensibilidad de modalidades recientes, tales OptiMAL 48 (Kolaczinski *et al.*, 2004) y OptiMAL IT (De Monbrison *et al.*, 2004).

Respecto al seguimiento de la respuesta terapéutica, las PRDM basadas en la pesquisa de la LDH del parásito, por su relación con parásitos viables, se

consideran más fiables que las trazadoras de PfHRP-2 o de p-aldolasa (Tarimo *et al.*, 2001; Tjitra *et al.*, 2001a; 2001b; Huong *et al.*, 2002; Grobusch *et al.*, 2003).

## CONCLUSIONES

Las PRDM representan una visión novedosa del diagnóstico del paludismo mediante el testimonio de una impronta coloreada sobre una pieza de papel de nitrocelulosa. Los formatos comercializados proporcionan pruebas expeditas sin el auxilio de instrumentos, pero ninguna alcanza la sensibilidad de la GG. La mayoría cumple el propósito de diagnosticar específicamente a *P. falciparum* y por exclusión a otros parásitos maláricos. Aunque algunos formatos comerciales refieren las siglas Pf/Pv ninguno tiene el potencial de proporcionar diagnóstico específico de paludismo por *P. vivax* y menos por *P. malariae* o *P. ovale*.

El número creciente de estudios de campo publicados sobre las PRDM, reúne una diversidad de diseños y metodologías a la postre enmarañadora de las comparaciones. Notablemente, varían los objetivos abordados, las poblaciones enroladas difieren en sus características, escasea la información de la rigurosidad de la microscopia de la referencia, el tamaño de la muestra de estudio arroja dudas sobre la fortaleza estadística de los datos, en muchos casos no se proveen datos del desempeño de la prueba según la densidad de la parasitemia y a menudo falta información del prototipo utilizado y de los detalles de su fabricación.

La evolución incesante de las PRDM conlleva la disponibilidad de múltiples prototipos, a menudo indistinguibles en base a su empaquetamiento, etiquetamiento o fecha de producción, posiblemente las inconsistencias informadas sobre el desempeño de dispositivos que llevan el mismo nombre comercial bien pueden ser atribuidas a variaciones de fabricación y a modificaciones inherentes al desarrollo reiterativo del producto.

El costo de las pruebas rápidas según el producto y cantidad se ha estimado entre 0,60 y 2,50 US\$ que es aparentemente superior al costo del diagnóstico microscópico de rutina valorado entre 0,12 y 0,40 US\$ por frotis (WHO, 2000).

La facilidad de ejecución e interpretación de la mayoría de los formatos disponibles en el mercado, redundan en beneficio del diagnóstico confirmado de paludismo en la periferia del sistema de salud y más aun en las zonas de transmisión baja o moderada, donde los sujetos carecen de inmunidad y las demoras del diagnóstico conllevan el riesgo potencial de una malaria complicada o fatal. Considerando a las PRDM un valioso complemento a la microscopia, hay pocas dudas de su utilidad en provecho del tratamiento oportuno y consecuente disminución de la morbilidad y mortalidad. La introducción de nuevos esquemas terapéuticos basados en las combinaciones con artemisinina, costosos y por lo pronto única alternativa al tratamiento de la malaria multi-resistente a drogas, obliga a una mayor rigurosidad en el diagnóstico, asunto en el que seguramente hay amplio espacio para el aprovechamiento de las PRDM.

El campo de las PRDM es muy dinámico, es altamente probable que algunas de las dificultades técnicas actuales relacionadas con la estabilidad de los reactivos, disminución de los pasos de ejecución y discriminación jerárquica de las densidades parasitarias, resulten corregidas en el futuro próximo.

El aprovechamiento de las PRDM también estará sujeto a la validación previa de estos ensayos en las diferentes zonas endémicas donde se pretenda su aplicación. En una comunicación reciente un comité de la OMS ha alertado a los países endémicos sobre la importancia de la capacitación local en los conocimientos y prácticas necesarias al uso racional de las nuevas tecnologías de diagnóstico (Banoo *et al.*, 2006). Superadas estas dificultades, el costo continuará siendo, seguramente, el mayor obstáculo que enfrentarán los países en desarrollo si decidieran aprovechar estos y posiblemente otros adelantos tecnológicos, en beneficio del control de la malaria. El problema trasciende a la comunidad científica y reclama una decisión política global con el consenso de todos los involucrados.

## Rapid tests for malaria diagnosis

### SUMMARY

Rapid tests for malaria diagnosis use basic principles of lateral flow immuno-chromatography to identify specific molecules secreted by the blood

stages of malaria parasites. They are simple and rapid to execute without laboratory equipment, sensitive and friendly to use. The first generation identified *Plasmodium falciparum* only. Later on, those distinguishing between *falciparum* malaria and non-*falciparum* malaria were developed. Antigenic targets more commonly used have been the histidine rich protein 2 of *P. falciparum* and the aldolase and lactate dehydrogenase enzymes of *Plasmodium* sp. Those criticizing rapid tests for malaria diagnosis refer to poor sensitivity mainly with low-density parasitaemias, false positive, false negatives along with their inability to diagnose mixed infections, to recognize *Plasmodium vivax* and to quantify the parasitaemias. The performance of the above-mentioned tests in endemic areas, the evolution of their prototypes, their reliability in the improvement of diagnosis, cost/benefit relation and potential problems with the interpretation of the tests after anti-malarial treatment are discussed in this review. Successful application of malaria rapid diagnosis tests in endemic areas should focus on the evaluation of current and new devices in local settings and on the promotion and enhancement of training in technical skills for health workers in endemic countries.

**Key words:** malaria, diagnosis, PfHRP-2, pLDH, p-aldolase

## REFERENCIAS

Aron J.L. (1982). Malaria epidemiology and detectability. *Trans. R. Soc. Med. Hyg.* **76**: 595-601.

Baker J., McCarthy J., Gatton M., Kyle D.E, Belizario V., Luchavez J, Bell D. & Cheng Q. (2005). Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 (PfHRP2) and its effect on the performance of PfHRP2-based rapid diagnostic tests. *J. Infect. Dis.* **192**: 870-877.

Banchongaksorn T., Prajakwong S., Rooney W. & Vickers P. (1997). Operational trial of ParaSight-F (dipstick) in the diagnosis of *falciparum* malaria at the primary health care level. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* **28**: 243-246.

Banoo S., Bell D., Bossuyt P., Herring A., Mabey D., Poole F. *et al.*, (2006). Evaluation of diagnostic

tests for infectious diseases: general principles. *Nature Reviews Microbiology.* **4**: S21-S31.

- Barat L., Chipipa J., Kolczak M. & Sukwa T. (1999). Does the availability of blood slide microscopy for malaria at health centers improve the management of persons with fever in Zambia? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **60**: 1024-1030.
- Beadle C., Long GW., Weiss W., McElroy P., Maret S., Oloo A. & Hoffman S. (1994). Diagnosis of malaria by detection of *Plasmodium falciparum* HRP-2 antigen with a rapid dipstick antigen-capture assay. *Lancet.* **343**: 564-568.
- Berry A., Fabre R., Benoit-Vical F., Cassaing S. & Magnaval J.F. (2005). Contribution of PCR-based methods to diagnosis and management of imported malaria. *Med. Trop.* **65**: 176-183.
- Bosch I., Bracho C. & Pérez H.A. (1996). Diagnosis of malaria by acridine orange fluorescent microscopy in an endemic area of Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **91**: 83-86.
- Breman J.G. (2001). The ears of the hippopotamus: manifestations, determinants and estimates of the malaria burden. *Am. J. Trop. Med.* **64** (Suppl. 1-2): 1-11.
- Breman J.G., Alilio M.S. & Mills A. (2004). Conquering the intolerable burden of malaria: what's new, what's needed: a summary. *Am. J. Trop. Med.* **7** (Suppl. 2): 1-15.
- Bruce-Chwatt L.J. (1986). *Essential Malariaology*. William Heinemann Medical Books Ltd. London.
- Cáceres J.L., Vaccari E., Campos E., Terán E., Ramírez A., Ayala C. & Itriago M. (2006). Concordancia del diagnóstico malárico en Venezuela, año 2003. *Bol. Dir. Malarial. San. Amb.* **66**: 49-57.
- Campbell C.C. (1991). Challenges facing antimalarial therapy in Africa. *J. Infect. Dis.* **163**: 1207-1211.
- Caraballo A. & Aché A. (1996). The evaluation of a dipstick test for *Plasmodium falciparum* in mining areas of Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **55**: 482-484.

- Cloonan N., Fischer K., Cheng Q. & Saul A. (2001). Aldolase genes of *Plasmodium* species. *Mol. Biochem. Parasitol.* **113**: 327-330.
- Coleman R.E., Maneechai N., Rachapaew N., Kumpitak C., Soyseng V., Miller R.S., Thimasarn K. & Sattabongkot J. (2002). Field evaluation of the ICT Malaria Pf/Pv immunochromatographic test for the detection of asymptomatic malaria in a *Plasmodium falciparum/vivax* endemic area in Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **66**: 379-383.
- Craig M.H. & Sharp B.L. (1997). Comparative evaluation of four techniques for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* infections. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **91**: 279-282.
- Cropley I.M., Lockwood D.N., Mack D., Pasvol G. & Davidson R.N. (2000). Rapid diagnosis of *falciparum* malaria by using the ParaSight F test in travellers returning to the United Kingdom: prospective study. *BMJ.* **321**: 484-485.
- De Abreu N., Zabala L. & Pérez H.A. (2001). El PCR versus la microscopia y la prueba de OPTIMAL en el diagnóstico de la malaria. *Rev. Talleres.* **7**: 151.
- De Monbrison F., Gerome P., Chaulet J.F., Wallon M., Picot S. & Peyron F. (2004). Comparative diagnostic performance of two commercial rapid tests for malaria in a non-endemic area. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **23**: 784-786.
- Forney J.R., Magill A.J., Wongsrichanalai C., Sirichaisinthop J., Bautista C.T., Heppner D.G. *et al.*, (2001). Malaria rapid diagnostic devices: performance characteristics of the ParaSight F device determined in a multisite field study. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 2884-2890.
- Forney J.R., Wongsrichanalai C., Magill A.J., Craig L.G., Sirichaisinthop J., Bautista C.T. *et al.*, (2003). Devices for rapid diagnosis of Malaria: evaluation of prototype assays that detect *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 and a *Plasmodium vivax*-specific antigen. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 2358-2366.
- Fryauff D.J., Purnomo., Sutamihardja M.A., Elyazar I.R.S., Susanti I., Krisin. *et al.*, (2000). Performance of the Optimal assay for detection and identification of malaria infections in asymptomatic residents of Irian Jaya, Indonesia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **63**: 139-145.
- Gautam A.S., Sharma R.C., Bhatt R.M. & Gupta D.K. (1992). Microscopic diagnosis of malaria in Kheda District of Gujarat. *Indian J. Malariol.* **29**: 83-87.
- Gaye O., Diouf M., Dansokho E. F., McLaughlin G. & Diallo S. (1998). Diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria using ParaSight F, ICT malaria PF and malaria IgG CELISA assays. *Parasite.* **5**: 189-192.
- Greenberg A. & Lobel H.O. (1990). Mortality from *Plasmodium falciparum* malaria in travelers from the United States. *Ann. Intern. Med.* **113**: 326-327.
- Greenwood B. (2002). The molecular epidemiology of malaria. *Trop. Med. Int. Health.* **7**: 1012-1021.
- Grobusch M.P., Alpermann U., Schwenke S., Jelinek T., Warhurst D.C. (1999). False-positive rapid tests for malaria in patients with rheumatoid factor. *Lancet.* **353**: 297.
- Grobusch M.P., Hanscheid T., Gobels K., Slevogt H., Zoller T., Rogler G. & Teichmann D. (2003). Comparison of three antigen detection tests for diagnosis and follow-up of *falciparum* malaria in travellers returning to Berlin, Germany. *Parasitol. Res.* **89**: 354-357.
- Hay S.I., Guerra C.A., Tótem A.J., Noor A.M. & Snow R.W. (2004). The global distribution and population at risk of malaria: past, present and future. *Lancet. Infect. Dis.* **4**: 327-336.
- Hayward R.E., Sullivan D.J. & Day K.P. (2000). *Plasmodium falciparum*: Histidine-rich protein II is expressed during gametocyte development. *Exp. Parasitol.* **96**: 139-146.
- Humar A., Ohrt C., Harrington M.A., Pillai D. & Kain K.C. (1997). Parasight F test compared with the polymerase chain reaction and microscopy for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria in travelers. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **56**: 44-48.
- Huong N.M., Davis T.M., Hewitt S., Huong N.V., Uyen T.T., Nhan D.H. *et al.*, (2002). Comparison

- of three antigen detection methods for diagnosis and therapeutic monitoring of malaria: a field study from southern Vietnam. *Trop. Med. Int. Health*. **7**: 304-308.
- Iqbal J., Hira P. R., Sher A. & Al-Enezi A. A. (2001). Diagnosis of imported malaria by *Plasmodium* lactate dehydrogenase (pLDH) and histidine-rich protein 2 (PfHRP-2)-based immunocapture assays. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **64**: 20-23.
- Iqbal J., Sher A., Hira P. R. & Al-Owaish R. (1999). Comparison of the OptiMAL test with PCR for diagnosis of malaria in immigrants. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 3644-3646.
- Iqbal J., Siddique A., Jameel M. & Hira P. R. (2004). Persistent histidine-rich protein 2, parasite lactate dehydrogenase, and panmalarial antigen reactivity after clearance of *Plasmodium falciparum* mono-infection. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 4237-4241.
- Iqbal J., Khalid N. & Hira P. R. (2003). Performance of rapid malaria Pf antigen test for the diagnosis of malaria and false- reactivity with autoantibodies. *Adv. Exp. Med. Biol.* **531**: 135-148.
- Kachur S. P., Nicolas E., Jean-Francois V., Benitez A., Bloland P.B., Saint Jean Y. *et al.*, (1995). Prevalence of malaria parasitemia and accuracy of microscopic diagnosis in Haiti. *Rev. Panam. Salud Publica.* **3**: 35-39.
- Kain K. C., Harrington M.A., Tennyson S. & Keystone J.S. (1998). Imported malaria: prospective analysis of problems in diagnosis and management. *Clin. Infect. Dis.* **27**: 142-149.
- Karbwang J., Tasanor O., Kanda T., Wattanagoon Y., Ibrahim M., Na-Bangchang K. *et al.*, (1996). ParaSight -F test for the detection of treatment failure in multidrug resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **90**: 513-515.
- Kawamoto F. (1991). Rapid diagnosis of malaria by fluorescence microscopy with light microscopy and interference filters. *Lancet*. **1**: 200-202.
- Kolaczinski J., Mohammed N., Ali I., Ali M., Khan N., Ezard N. *et al.*, (2004). Comparison of the OptiMAL® rapid antigen test with field microscopy for the detection of *Plasmodium vivax* and *P. falciparum*: considerations for the application of the rapid test in Afghanistan. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **98**: 15-20.
- Lee N., Baker J., Andrews K. T., Gatton M.L., Bell D., Cheng Q. *et al.*, (2006a). Effect of sequence variation in *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 on binding of specific monoclonal antibodies: Implications for rapid diagnostic tests for malaria. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 2773-2778.
- Lee N., Baker J., Bell D., McCarthy J. & Cheng Q (2006b). Assessing the genetic diversity of the aldolase genes of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* and its potential effect on the performance of Aldolase-detecting Rapid Diagnostic Tests (RDTs). *J. Clin. Microbiol.* Publicación virtual pre-impresión, octubre 4 2006, doi:10.1128/JCM.01611-06
- Leke R. F., Djokam R. R., Mbu R., Leke R. J., Fogako J., Megnekou R. *et al.*, (1999). Detection of the *Plasmodium falciparum* antigen histidine-rich protein 2 in blood of pregnant women: implications for diagnosing placental malaria. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 2992-2996.
- Lema O. E., Carter J.Y., Nagelkerke N., Wangai M.W., Kitenge P., Gikunda S.M. *et al.*, (1999). Comparison of five methods of malaria detection in the outpatient setting. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **60**: 177-182.
- Lowe B. S., Jeffa N. K., New L., Pedersen C., Engbaek K. & Marsh K. (1996). Acridine orange fluorescence technique as alternative to traditional Giemsa staining for the diagnosis of malaria in developing countries. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **90**: 34-36.
- Mason D. P., Kawamoto F., Lin K., Laoboonchai A. & Wongsrichanalai C. (2002). A comparison of two rapid field immunochromatographic tests to expert microscopy in the diagnosis of malaria. *Acta Trop.* **82**: 51-59.
- Mayxay M., Pukritrakamee S., Chotivanich K., Imwong M., Looareesuwan S. & White N. J. (2001a). Identification of cryptic coinfection with *Plasmodium falciparum* in patients presenting with *vivax* malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **65**: 588-592.

- Mayxay M., Pukrittayakamee S., Chotivanich K., Looareesuwan S. & White N.J. (2001b). Persistence of *Plasmodium falciparum* HRP-2 in successfully treated acute *falciparum* malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **95**: 179-182.
- Moody A. H. & Chiodini P. L. (2002). Non microscopic method for malaria diagnosis using OptiMAL IT, a second generation dipstick for malaria pLDH antigen detection. *Br. J. Biomed. Sci.* **59**: 228-231.
- Moody A., Hunt-Cooke A., Gabbett E. & Chiodini P. (2000). Performance of the OptiMal\_ malaria antigen capture dipstick for malaria diagnosis and treatment monitoring at the Hospital for Tropical Diseases, London. *Br. J. Haematol.* **109**: 891-894.
- Oduola A. M., Omitowoju G. O., Sowunmi A., Makler M. T., Falade C. O., Kyle D. E. *et al.*, (1997). *Plasmodium falciparum*: evaluation of lactate dehydrogenase in monitoring therapeutic responses to standard antimalarial drugs in Nigeria. *Exp. Parasitol.* **87**: 283-289.
- Palmer C.J., Lindo J.F., Klaskala W.I., Quesada J.A., Kaminsky R., Baum M.K. *et al.*, (1998). Evaluation of the OptiMAL test for rapid diagnosis of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* malaria. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 203-206.
- Panton L.J., McPhie P., Maloy W.L., Wellems T.E., Taylor D.W. & Howard R.J (1989). Purification and partial characterization of an unusual protein of *Plasmodium falciparum*: histidine-rich protein II. *Mol. Biochem. Parasitol.* **35**: 149-160.
- Penhalbel R de S., Fugikaha E., Lorenzetti A., Alves R.T., Cavasini C.E., Rossit A.R *et al.*, (2005). Evaluation of an immunochromatography test for malaria diagnosis under different storage conditions. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **38**: 194-195.
- Piper R., Lebrass J., Wentworth L., Hunt-Cooke A., Houze S., Chiodini P. *et al.*, (1999). Immunocapture diagnosis assays for malaria using *Plasmodium* lactate dehydrogenase. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **60**: 109-118.
- Postigo M., Mendoza-León A. & Pérez H. A. (1998) Malaria diagnosis by the polymerase chain reaction: A field study in south-eastern Venezuela. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **92**: 509-511.
- Richter J., Gobels K., Muller-Stover I., Hoppenheit B. & Haussinger D. (2004). Co-reactivity of plasmodial histidine-rich protein 2 and aldolase on a combined immuno-chromographic-malaria dipstick (ICT) as a potential semi-quantitative marker of high *Plasmodium falciparum* parasitaemia. *Parasitol. Res.* **94**: 384-385.
- Rickman L., Oberst R., Sangalang R., Chulay J., Long G., Cabanban A. *et al.*, (1989). Rapid diagnosis of malaria by acridine orange staining of centrifuged parasites. *Lancet.* **1**: 68-71.
- Schneider E. L. & Marletta M. A. (2005). Heme binding to the histidine-rich protein II from *Plasmodium falciparum*. *Biochemistry.* **44**: 979-986.
- Sherman I. W. (1961). Molecular heterogeneity of lactic dehydrogenase in avian malaria (*Plasmodium lophurae*). *J. Exp. Med.* **114**: 1049-1062.
- Shiff C., Premji Z. & Minjas J. (1993). The rapid manual Parasight-F test. A new diagnostic tool for *Plasmodium falciparum* infection. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **87**: 646-648.
- Singh B., Bobogare A., Cox-Singh J., Snounou G., Abdullah M.S. & Rahman H.A. (1999). A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **60**: 687-692.
- Singh N., Saxena, A. & Valecha, N. (2000). Field evaluation of the ICT malaria P.f/P.v immunochromatographic test for diagnosis of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* infection in forest villages of Chhindwara, central India. *Trop. Med. Int. Hlth.* **5**: 765-770.
- Singh N., Valecha N. & Sharma V. P. (1997). Malaria diagnosis by field workers using an immunochromatographic test. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **91**: 396-397.
- Snounou G., Viriyakosol S., Jarra W., Thaithong S. & Brown N. (1993). High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol. Biochem. Parasitol.* **61**: 315-320.
- Sullivan D.J Jr., Gluzman I.Y. & Goldberg D.E. (1996). *Plasmodium* hemozoin formation mediated by histidine-rich proteins. *Science.* **271**: 219-222.

- Tarimo D.S., Minjas J.N. & Bygbjerg I.C. (2001). Malaria diagnosis and treatment under the strategy of the integrated management of childhood illness (IMCI): relevance of laboratory support from the rapid immunochromatographic tests of ICT Malaria P.f/P.v and OptiMal. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **95**: 437-444.
- Tjitra E., Suprianto S., Dyer M., Currie B. J. & Anstey N.M. (1999). Field evaluation of the ICT malaria P.F/P.v immunochromatographic test for detection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in patients with a presumptive clinical diagnosis of malaria in eastern Indonesia. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 2412-2417.
- Tjitra E., Suprianto S., Dyer M. E., Currie B. J. & Anstey N.M. (2001a). Detection of histidine rich protein 2 and panmalarial ICT Malaria Pf/ Pv test antigens after chloroquine treatment of uncomplicated *falciparum* malaria does not reliably predict treatment outcome in eastern Indonesia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **65**: 593-598.
- Tjitra E., Suprianto S., McBroom J., Currie B. J. & Anstey N. M. (2001b). Persistent ICT malaria P.f/P.v panmalarial and HRP2 antigen reactivity after treatment of *Plasmodium falciparum* malaria is associated with gametocytemia and results in false-positive diagnoses of *Plasmodium vivax* in convalescence. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 1025-1031.
- Uguen C., Rabodonirina M., De Pina J. J., Vigier J. P., Martet G., Maret M. *et al.*, (1995). ParaSight-F rapid manual diagnostic test of *Plasmodium falciparum* infections. *Bull. World. Health. Org.* **73**: 643-649.
- Vakharia S., Gopinathan N. & Kshirsagar N. A. (1997). The ParaSight-F test for detecting treatment failure. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **91**: 490-491.
- Valecha N., Sharma V. P. & Devi C. U. (1998). A rapid immunochromatographic test (ICT) for diagnosis of *Plasmodium falciparum*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **30**: 257-260.
- Wongsrichanalai C., Chuanak N., Tulyayon S., Thanosingha N., Laboonchal A., Thimasarn T.G. *et al.*, (1999). Comparison of a rapid field immunochromatographic test to expert microscopy for the detection of *Plasmodium falciparum* asexual parasitemia in Thailand. *Acta Trop.* **73**: 263-273.
- WHO (1993). *Implementation of a Global Malaria Control Strategy*. WHO Technical report Series 839. Geneva.
- WHO (2000). *New perspectives: malaria diagnosis*. Report of a Joint WHO/USAID informal consultation, 25-27 October 1999. Document WHO/ CDS/ RBM/ 2000. 14. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- WHO (2005). *World Malaria Report*. RBM/WHO/ UNICEF. Geneva.

Recibido el 27/10/2006  
Aceptado el 16/12/2006

