

O exame parasitológico de fezes frente a campanhas de desparasitação em massa – novos desafios e alternativas

The parasitological stool examination in front of mass deworming campaigns - new challenges and alternatives

Yvanna Louise Di Christine Oliveira¹, Silvio Santana Dolabella²

¹ Farmacêutica e Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Sergipe. Doutoranda em Ciências Farmacêuticas. São Cristóvão, SE, Brasil.

² Farmacêutico e Doutor em Parasitologia pela Universidade Federal de Minas Gerais. Atualmente Professor Associado da Universidade Federal de Sergipe. São Cristóvão, SE, Brasil.

Resumo

Com a ampliação e a frequência das campanhas de desparasitação contra os geo-helmintos *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, ancilostomídeos e *Strongyloides stercoralis*, ocorreu, como esperado, a redução da prevalência e da morbidade associada a estas parasitoses. Entretanto, alterações no perfil parasitológico das populações com redução dos helmintos e aumento significativo das protozooses intestinais se tornaram evidentes em todo o mundo. Além disso, a redução de carga parasitária tem dificultado o diagnóstico de rotina por meio de técnicas microscópicas de baixa sensibilidade. Neste artigo trazemos atualizações sobre algumas técnicas diagnósticas, como a Técnica de Sedimentação Espontânea em Tubo (SSTT), FLOTAC/Mini-FLOTAC e a otimização do método de Kato-Katz, além de alternativas viáveis para aumentar a sensibilidade dos métodos e tornar o diagnóstico das parasitoses intestinais mais preciso.

Palavras-chave: Helmintíase; Quimioprevenção; Técnicas de Laboratório Clínico

Abstract

With the expansion and increased frequency of deworming against soil-transmitted helminths *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, hookworms and *Strongyloides stercoralis*, there was, as expected, a reduction in the prevalence and morbidity associated with these diseases. However, changes in the parasitological profile of populations, with a reduction in helminths and a significant increase in intestinal protozoa, became evident worldwide. In addition, the reduction in the parasitic burden has made routine diagnosis difficult through low-sensitivity microscopic techniques. In this article we bring updates on diagnostic techniques, such as spontaneous sedimentation technique in tube (SSTT), FLOTAC/Mini-FLOTAC and optimization of Kato-Katz technique, as well as viable alternatives to increase the sensitivity of methods and make the diagnosis of intestinal parasites more accurate.

Keywords: Helminthiasis; Mass Drug Administration; Clinical Laboratory Techniques

Correspondência

Silvio Santana Dolabella

Universidade Federal de Sergipe

Laboratório de Entomologia e Parasitologia Tropical,

Departamento de Morfologia, CCBS/UFS.

Av. Marechal Rondon, s/n - B. Jardim Rosa Elze

São Cristóvão, Sergipe. CEP 49.100-000.

E-mail: dolabellaufs@gmail.com

Recebido em 03/07/2021 | Aprovado em 07/03/2022 | DOI: 10.21877/2448-3877.202202162

INTRODUÇÃO

Os geo-helmintos *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, ancilostomídeos e *Strongyloides stercoralis* são os causadores mais comuns de helmintíases nas regiões tropicais e subtropicais. A prevalência destas infecções depende de fatores ecológicos e climáticos que favoreçam o ciclo de vida de cada espécie de parasito, bem como de elementos sociocomportamentais que contribuam para a sua disseminação.⁽¹⁾ Até 2017 estimava-se que 513 milhões de pessoas no mundo estavam infectadas com algum tipo de geo-helminto e cerca de 835 milhões necessitavam de quimioterapia profilática.⁽²⁾

Em 2003, a Organização Mundial da Saúde (OMS) começou a concentrar medidas de controle para 19 doenças tropicais negligenciadas (DTNs) visando as necessidades de saúde de comunidades carentes. Isso ocasionou a introdução da quimioterapia preventiva, visando otimizar o uso de medicamentos em dose única em larga escala e oferecendo aos pacientes uma alternativa para reduzir a extensa morbidade associada à fibrose linfática, à oncocercose, ao tracoma, às geo-helmintíases e às esquistossomoses, entre outras doenças.⁽²⁾

A administração da quimioterapia profilática abrange grupos considerados de risco para as morbidades associadas a estas doenças, como crianças em idade escolar, gestantes e adultos em profissões de risco, como mineiros e agricultores.⁽³⁾ A recomendação é que os anti-helmínticos sejam administrados sem diagnóstico individual prévio para pessoas em risco que vivem em áreas endêmicas. A frequência anual de tratamento é recomendada quando a prevalência da infecção por qualquer geo-helminto na comunidade estiver entre 20% e 50%, em casos nos quais a prevalência for superior a 50%, o tratamento semestral é indicado.⁽³⁾

No Brasil, os grupos de risco atendidos por estas campanhas compreendem apenas as crianças, pois a desparasitação foi integrada aos programas de saúde realizados nas escolas da rede pública de ensino.⁽⁴⁾ Desta forma, as escolas fornecem um importante ponto de entrada para as atividades de desparasitação, além de proporcionar fácil acesso a componentes de educação sobre saúde e higiene.⁽³⁾

A meta global era reduzir a carga parasitária e a morbidade ocasionadas por geo-helmintos em crianças até 2020, com o objetivo de promover o tratamento regular de pelo menos 75% das crianças em áreas endêmicas até o fim do prazo estipulado.⁽³⁾ Entretanto, até o final de 2019 apenas 22% dos países envolvidos nesta campanha alcançaram a meta proposta, sendo que outros 20%, incluindo o Brasil, não

forneceram dados suficientes para a avaliação da cobertura.⁽⁵⁾ Assim, o prazo acabou sendo ampliado para 2030 e o controle do parasito *S. stercoralis*, com administração de ivermectina, foi introduzido como objetivo da campanha.⁽³⁾

Com a ampliação e a frequência das campanhas de desparasitação ocorreu, como esperado, a redução da prevalência e da morbidade associada a estas parasitoses devido à redução da carga parasitária nos indivíduos infectados.⁽⁶⁾ O que não foi discutida anteriormente, e se mostrou evidente, foi a mudança no perfil epidemiológico das populações devido à redução das helmintíases com concomitante aumento das protozooses intestinais,^(7,8) que apresentam potencial de causar tanto danos à saúde dos pacientes quanto às helmintíases.

No tocante ao diagnóstico, rotineiramente são utilizadas técnicas de sensibilidade limitada para estimar a carga parasitária e assim atestar a eficácia do tratamento quimioprofilático. Infelizmente, as técnicas utilizadas para o diagnóstico das parasitoses intestinais apresentam falhas nos casos em que há baixas quantidades de ovos nas fezes.⁽⁹⁾ Destarte, novos desafios surgiram, pois métodos mais sensíveis se tornam necessários para o diagnóstico fidedigno destes pacientes. Assim, este estudo objetiva discutir as mudanças no perfil parasitológico em áreas endêmicas para geo-helmintíases e os desafios enfrentados pelos profissionais no diagnóstico destas doenças nesta nova realidade.

Quimioprofilaxia em massa: mudanças no perfil parasitológico das populações

A desparasitação em massa com foco no controle de geo-helmintos trouxe diversos benefícios para a população geral em razão da redução de morbidade e carga parasitária. Em diversas regiões do mundo foram realizados estudos epidemiológicos para avaliar a efetividade das campanhas. Na África, em Malawi, a taxa de infecção para qualquer geo-helminto foi inferior a 8% para a população geral e de 4,6% entre os escolares, que são o público-alvo das campanhas.⁽¹⁰⁾ A redução foi reportada em outras regiões, como na África Subsaariana, onde a prevalência de geo-helmintos caiu de 44% para 18% no período de 18 anos, atribuída, dentre outros fatores, à quimioterapia profilática.⁽¹¹⁾

Na Ásia, em Myanmar, a prevalência caiu significativamente de aproximadamente 28% para 9% para os geo-helmintos.⁽¹²⁾ Já na Indonésia a queda foi de 19,6% para 6%.⁽¹³⁾ Em países da América do Sul foram identificadas prevalências inferiores a 2% para *A. lumbricoides* e *T. trichiura* na Bolívia;⁽⁷⁾ e de 7,4%, 4,5% e 0,4% para ascaridíase, tricuriíase e ancilostomíase, respectivamente, no Brasil.⁽⁸⁾

Neste contexto surgiu outra problemática: o gradual, porém significativo, aumento da prevalência de protozooses intestinais. Este perfil tem sido observado em diferentes regiões do mundo, como na Bolívia e no Brasil, que reportaram grande aumento de *Blastocystis hominis* e *Entamoeba* spp.^(7,8) em locais onde antes a prevalência era próxima a zero.

Na Burquina, país africano, a prevalência de protozoários intestinais foi maior que 80% entre as crianças, principalmente *Entamoeba histolytica*/*E. dispar*, *E. coli* e *Giardia lamblia*, enquanto a prevalência de geo-helmintos foi de 10,7%.⁽¹⁴⁾ No Nepal, Ásia, isto também se tornou evidente, pois os parasitos mais encontrados entre escolares foram *G. lamblia* (46,8%), *E. histolytica*/*E. dispar* (23,4%) e *E. coli* (21,3%), enquanto os helmintos foram pouco encontrados (<2%).⁽¹⁵⁾

Esta mudança de perfil epidemiológico de diferentes populações que receberam tratamento quimioprofilático em massa levanta um importante ponto de discussão: o parasitismo se mantém devido às condições sanitárias as quais essas populações estão expostas. O fornecimento regular de água tratada (evitando o transporte e o armazenamento inadequados), o acesso a banheiros e a saneamento básico (com tratamento de esgoto), a higienização adequada de alimentos consumidos crus e a lavagem frequente de mãos com água e sabão antes das refeições e após a defecação são fatores protetivos contra parasitoses.⁽¹⁶⁾

Entretanto, isso ainda não é realidade em comunidades rurais e, mesmo em algumas áreas urbanas periféricas em países como o Brasil, o investimento em saneamento ainda é precário, o que expõe a população a diversos problemas de saúde como doenças diarreicas e parasitoses intestinais. No estudo de Medeiros e Ferreira,⁽¹⁷⁾ que avaliou diversas cidades brasileiras quanto ao fornecimento adequado dos serviços de água e esgoto, apenas 20% destas cidades apresentaram serviços classificados como eficientes, com capitais onde a taxa de eficiência de saneamento foi de apenas 52%.⁽¹⁷⁾

Redução de carga parasitária e impacto sobre o diagnóstico

Muitos benefícios em saúde foram alcançados com o tratamento quimioprofilático para as geo-helmintíases, como a redução da morbidade, das hospitalizações e do DALY, do inglês *disability-adjusted life years*, que se refere aos anos de vida perdidos mais os anos de vida vividos com uma deficiência. Houve redução de até 68% de DALY, com impacto mais significativo no primeiro ano do programa de desparasitação no Vietnã.⁽¹⁸⁾

Mas, além dos impactos supracitados, outra mudança de importância médica é a redução da carga parasitária

nos indivíduos infectados por helmintos intestinais. Em diversos estudos foram relatadas reduções na contagem de ovos após rodadas sucessivas de tratamento. No Congo, com uma cobertura de tratamento superior a 80%, em três anos a média da contagem de ovos de *A. lumbricoides* foi reduzida de 9.844 ovos por grama de fezes (opg) para 724 opg, a redução observada para *T. trichiura* foi de 1107 para 366 opg e os ancilostomídeos foram indetectáveis após o primeiro ano de tratamento.⁽¹⁹⁾

Em outro estudo, realizado no Kenya pelo período de três anos, a prevalência geral das geo-helmintíases caiu pela metade. Com relação à quantidade de ovos, para *A. lumbricoides* a redução foi de 1.659 para 960 opg, para *T. trichiura* de 33 para 17 opg e para ancilostomídeos de 63 para 33 opg. A redução relativa das infecções foi de 87% para ancilostomídeos, 42% para *A. lumbricoides* e 49,5% para *T. trichiura*.⁽²⁰⁾

No tocante ao diagnóstico, esta mudança evidencia dificuldades intrínsecas aos laboratórios de análises clínicas: o diagnóstico correto utilizando técnicas microscópicas de baixa sensibilidade. Além da constante necessidade de treinamento e reciclagem dos laboratoristas e do investimento em controle de qualidade, é preciso considerar que o número de ovos excretados pelos parasitos e posteriormente identificados e/ou contados num exame parasitológico de fezes (EPF) depende de duas principais variantes: a excreção nas fezes e os fatores técnicos. A excreção depende de fatores biológicos que levam em consideração a relação parasito-hospedeiro e a oviposição.⁽²¹⁾

As diferentes espécies de geo-helmintos apresentam variados padrões de oviposição, com as fêmeas de *A. lumbricoides* liberando cerca de 200 mil ovos por dia, as de *T. trichiura* liberando até 20 mil e as de ancilostomídeos até 10 mil ovos.⁽²²⁾ Pode parecer muito, mas já foi demonstrado que o albendazol, utilizado rotineiramente nas campanhas de desparasitação, ocasiona alterações nos túbulos testiculares dos parasitos, promovendo infertilidade ou menor produção de ovos, muitas vezes com aumento da produção de ovos inférteis.⁽²³⁾ Todos esses fatores reduzem a oviposição e dificultam o diagnóstico.

No que diz respeito aos fatores técnicos, a técnica quantitativa mais utilizada nos laboratórios em razão do seu custo e por ser considerada padrão-ouro para a quantificação de ovos de *Schistosoma mansoni* e geo-helmintos é a técnica de Kato-Katz (KK), que consiste na estimativa do número de opg.⁽²¹⁾ Diversos fatores influenciam na redução da sensibilidade desta técnica. Dentre eles podemos citar o armazenamento

das fezes por período superior a 24 horas;⁽²⁴⁾ a quantidade de fezes utilizada, que no KK é equivalente a 42mg de fezes, inferior a outros métodos quantitativos como o Mini-FLOTAC e o FLOTAC, que utilizam 100mg e 500mg de fezes, respectivamente; e o fator de multiplicação (FM), que para o KK é de 24 para que o número de ovos na amostra analisada seja equivalente ao encontrado em 1g de material fecal, superior ao Mini-FLOTAC (FM = 10) e FLOTAC (FM = 2), o que torna o KK mais estimativo. Todos esses fatores reduzem a chance de visualização de ovos na amostra utilizada e induzem a erros diagnósticos.⁽²¹⁾

Sensibilidade dos métodos diagnósticos e alternativas

Diferentes métodos parasitológicos apresentam diferentes sensibilidades devido às suas variações intrínsecas, o que pode alterar o diagnóstico a depender dos fatores supracitados. Atualmente, como preconizado pela Organização Mundial da Saúde, o método padrão-ouro para diagnóstico da esquistossomose e das geo-helmintíases é o KK, em razão da sua facilidade de utilização, ao baixo custo e à alta sensibilidade em áreas de alta endemicidade. Entretanto, quando as localidades são de moderada a baixa endemicidade (as cargas parasitárias são reduzidas e/ou a população recebeu quimioterapia profilática), a sensibilidade deste método é reduzida.^(25,26)

Diante da sua ampla utilização, principalmente em áreas com recursos limitados e onde é realizado o rastreamento em massa, muitos autores têm investigado formas de aumentar a sensibilidade do KK. É sabido que a coleta de múltiplas amostras fecais e o exame de pelo menos duas lâminas de cada uma delas pode melhorar o resultado e elevar a sensibilidade para mais de 90%.^(25,26)

Outro estudo comprovou o aumento de prevalência em 23%, 26% e 100% para *A. lumbricoides*, *T. trichiura* e ancilostomídeos, respectivamente, com o exame de mais de uma amostra, com custo superior de apenas 31%.⁽²⁷⁾ Considerando os impactos ambientais e em saúde do subdiagnóstico (leia-se necessidade adicional de tratamento, aumento de morbidade e DALY's), o custo-benefício é bastante interessante e o diagnóstico preciso pode influenciar, inclusive, nas políticas públicas em saúde.

Ainda assim, diversos estudos no decorrer dos anos têm comparado os métodos diagnósticos a fim de definir qual o melhor a ser utilizado de acordo com as características da população em estudo, as condições financeiras, estruturais e logísticas de cada local e os recursos humanos disponíveis

para a execução destes, pois não se pode definir qual a melhor técnica baseando-se em apenas um critério.⁽²⁶⁾

Muitos métodos podem ser utilizados para o diagnóstico das geo-helmintíases além do KK, como métodos baseados em sedimentação/centrifugação (Hoffmann, Pons e Janer – HPJ, Ritchie, Blagg) e em flutuação (Faust). Entretanto, a desvantagem principal desses métodos é a impossibilidade de se quantificar os ovos e estimar a carga parasitária.⁽²⁸⁾ Neste caso, outras técnicas foram desenvolvidas para suprir esta necessidade, como o McMaster, o FECPAK, o FLOTAC/Mini-FLOTAC (métodos microscópicos) e a reação em cadeia da polimerase (PCR) (método molecular).

Porém, o teste mais utilizado nos laboratórios de análises clínicas ainda é o método HPJ, conhecido como método de Lutz ou sedimentação espontânea, que consiste na diluição das fezes em água destilada e na utilização da gravidade para a deposição dos detritos e das formas parasitárias no cálice de fundo cônico. Sua ampla utilização se dá em razão do baixo custo por teste realizado e da facilidade de manuseio e higienização dos materiais, que rapidamente podem ser reutilizados, além da possibilidade de se diagnosticar infecções por helmintos e protozoários.⁽²⁹⁾

Apesar destas vantagens, o HPJ é considerado um método de baixa sensibilidade, o que exige dos profissionais maior esforço para o diagnóstico correto. Devido a isso, Tello et al.⁽³⁰⁾ propuseram uma adaptação deste método que não impactaria em custos e tornaria o método mais sensível: a técnica de sedimentação espontânea em tubo (*spontaneous sedimentation technique in tube*, SSTT). No SSTT, 10g de fezes é diluída em 10mL de solução salina e homogeneizada de 30 a 60 segundos. A amostra é filtrada diretamente para um tubo cônico e agitada vigorosamente por 30 segundos, antes de ser posicionada verticalmente para a sedimentação por 45 minutos. Após este tempo, o sedimento deve ser recolhido com pipeta plástica, transferido para duas lâminas e corado com lugol para análise. Desta forma, o SSTT se mostrou mais sensível que o exame direto a fresco e que os métodos de concentração em formol-éter e de flutuação em sulfato de zinco para todos os parasitos avaliados, com prevalências de até o dobro dos encontrados por estas técnicas.⁽³⁰⁾

Devido à grande quantidade de amostras processadas, geralmente coletadas e/ou armazenadas incorretamente, o desconforto com o odor e a sujeira e por questões de biossegurança, foram desenvolvidos coletores adaptados que reduzem as etapas de processamento das amostras (diluição,

filtragem e posterior lavagem do material), como o Paratest®. São formas de otimização da técnica que reduzem tempo e custo. Foi demonstrado que a sensibilidade diagnóstica é semelhante para ambos, com repetibilidade (concordância) quase perfeita. A exceção foi para *Blastocystis* sp., cujo diagnóstico pelo Paratest® foi melhor, e ancilostomídeos, que foi mais identificado pelo HPJ.⁽³¹⁾

Dentre os novos métodos microscópicos, o FLOTAC/Mini-FLOTAC mostrou alta eficiência, com sensibilidade superior a 80% para todos os parasitos,⁽⁹⁾ principalmente quando a carga parasitária é mais baixa. Neste caso em particular, o FLOTAC/Mini-FLOTAC apresentou sensibilidade quase duas vezes maior que o KK (81,8% vs. 48,8%).⁽⁹⁾

Entretanto, esses dados variam de acordo com o estudo: Cools et al. mostraram que, mesmo com apenas uma lâmina, o KK foi superior ao Mini-FLOTAC para o diagnóstico de *A. lumbricoides* em indivíduos com baixa carga parasitária (55,6% vs. 42,1%). Isso não se repetiu para *T. trichiura* (79,6% vs. 85,6%) e ancilostomídeos (69,4% vs. 70,8%), mas os valores de sensibilidade foram bastante próximos. Além disso, a média do número de ovos em cada método foi bastante diferente para *A. lumbricoides* e ancilostomídeos, com o KK sendo superior para ambos (10.000 vs. 6.404 opg e 833 vs. 366 opg, respectivamente).⁽³²⁾

A alternativa mais eficaz desenvolvida para o diagnóstico de diferentes patógenos foi o PCR. Suas vantagens são inúmeras, dentre elas a capacidade de amplificação de pequenas quantidades de DNA, o que permite correlação com a carga parasitária, diagnóstico preciso em pacientes com carga parasitária reduzida, identificação específica de espécies cuja morfologia é similar, como ancilostomídeos e *Entamoeba* spp., e a possibilidade de diagnóstico simultâneo de múltiplas infecções. Entretanto, as desvantagens também são claras, como a necessidade de profissionais qualificados para o desenvolvimento e interpretação da técnica, o alto custo associado e a necessidade de infraestrutura e equipamentos específicos para a realização do exame. Isto inviabiliza a utilização desta técnica como rotina diagnóstica, estando atualmente restrita às instituições de pesquisa.⁽²⁶⁾

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com o exposto, pode-se identificar as dificuldades diagnósticas em regiões onde a população recebeu quimioterapia profilática por vários anos, como é o caso do Brasil. Os laboratórios de análises clínicas devem se atentar

para isso e se atualizar no tocante à otimização ou mesmo à substituição das técnicas utilizadas na rotina. Sabe-se que nem sempre é possível utilizar métodos de alta sensibilidade, como o PCR, visto o alto custo de implantação e manutenção. No entanto, alternativas viáveis, as quais não impactariam sobremaneira no custo dos exames, podem ser implementadas, como a otimização dos métodos utilizados; utilização do SSTT no lugar do HPJ; coleta de múltiplas amostras em dias alternados; preparo e leitura de pelo menos duas lâminas; treinamento, reciclagem e capacitação periódica dos profissionais; elaboração e atualização de procedimentos operacionais padrão (POP's) de acordo com as sugestões da literatura; ou mesmo a adoção de novos métodos microscópicos com maior sensibilidade, como o FLOTAC. Desta forma, os diagnósticos se tornam mais precisos, mais eficientes e os pacientes podem ser corretamente tratados, impedindo a transmissão e a continuidade do ciclo infeccioso das geo-helmintíases.

REFERÊNCIAS

- Jain SK, Dwivedi A, Shrivastava A, Vijayananth P, Vidyavardhini R, Venkatesh S. Prevalence of soil-transmitted helminthic infection in India in current scenario: a systematic review. *J Commun Dis*. 2016;48(2):24-35.
- World Health Organization (WHO). Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: First WHO report on neglected tropical diseases. 2010. [acesso em 28 jul 2021]. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44440>.
- World Health Organization (WHO). Soil-transmitted helminth infections. 2020a. [acesso em 28 jul 2021]. Disponível em: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/soil-transmitted-helminth-infections>.
- Brasil. Informe Técnico Operacional: "V Campanha Nacional de Hanseníase, Verminoses, Tracoma e Esquistossomose". Brasília: Ministério da Saúde; 2017.
- World Health Organization (WHO). Soil-transmitted helminthiasis: National coverage (%) of school-aged children: 2019. 2020b. [acesso em 28 jul 2021]. Disponível em: https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/sth/sth.html.
- Mwandawiro C, Okoyo C, Kihara J, Simiyu E, Kepha S, Campbell SJ, et al. Results of a national school-based deworming programme on soil-transmitted helminth infections and schistosomiasis in Kenya: 2012-2017. *Parasit Vectors*. 2019;12(1):76.
- Macchioni F, Segundo H, Gabrielli S, Totino V, Gonzales PR, Salazar E, et al. Dramatic decrease in prevalence of soil-transmitted helminths and new insights into intestinal protozoa in children living in the Chaco region, Bolivia. *Am J Trop Med Hyg*. 2015;92(4):794-6.
- Oliveira YLDC, Oliveira LM, Oliveira YLM, Nascimento AMD, La Corte R, Geraldi RM, et al. Changes in the epidemiological profile of intestinal parasites after a school-based large-scale treatment for soil-transmitted helminths in a community in northeastern Brazil: Epidemiological profile after large-scale school-based treatment for STH. *Acta Trop*. 2020;202:105279.
- Nikolay B, Brooker SJ, Pullan RL. Sensitivity of diagnostic tests for human soil-transmitted helminth infections: a meta-analysis in the absence of a true gold standard. *Int J Parasitol*. 2014;44(11):765-74.

10. Witek-McManus S, Simwanza J, Chisambi AB, Kepha S, Kamwendo Z, Mbwinja A, et al. Epidemiology of soil-transmitted helminths following sustained implementation of routine preventive chemotherapy: Demographics and baseline results of a cluster randomised trial in southern Malawi. *PLoS Negl Trop Dis.* 2021;15(5):e0009292.
11. Sartorius B, Cano J, Simpson H, Tusting LS, Marczak LB, Miller-Petrie MK, et al. Prevalence and intensity of soil-transmitted helminth infections of children in sub-Saharan Africa, 2000-18: a geospatial analysis. *Lancet Glob Health.* 2021;9(1):e52-e60.
12. Dunn JC, Bettis AA, Wyine NY, Lwin AMM, Tun A, Maung NS, et al. Soil-transmitted helminth reinfection four and six months after mass drug administration: results from the delta region of Myanmar. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019;13(2):e0006591.
13. Staal SL, Hogendoorn SKL, Voets SA, Tepper RC, Veenstra M, de Vos II, et al. Prevalence of atopy following mass drug administration with albendazole: a study in school children on Flores Island, Indonesia. *Int Arch Allergy Immunol.* 2018;177(3):192-8.
14. Erismann S, Diagbouga S, Odermatt P, Knoblauch AM, Gerold J, Shrestha A, et al. Prevalence of intestinal parasitic infections and associated risk factors among schoolchildren in the Plateau Central and Centre-Ouest regions of Burkina Faso. *Parasit Vectors.* 2016;9(1):554.
15. Gupta R, Rayamajhee B, Sherchan SP, Rai G, Mukhiya RK, Khanal B, et al. Prevalence of intestinal parasitosis and associated risk factors among school children of Saptari district, Nepal: a cross-sectional study. *Trop Med Health.* 2020;48:73.
16. Njambi E, Magu D, Masaku J, Okoyo C, Njenga SM. Prevalence of Intestinal Parasitic Infections and Associated Water, Sanitation, and Hygiene Risk Factors among School Children in Mwea Irrigation Scheme, Kirinyaga County, Kenya. *J Trop Med.* 2020;2020:3974156.
17. Medeiros RVV, Ferreira, TC. The impact of inefficient and inadequate sanitation diseases on the average cost of hospital admissions in Brazilian municipalities. *Estudo & Debate.* 2020; 27(2):88-107.
18. Debaveye S, Gonzalez Torres CV, De Smedt D, Heirman B, Kavanagh S, Dewulf J. The public health benefit and burden of mass drug administration programs in Vietnamese schoolchildren: Impact of mebendazole. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12(11):e0006954.
19. Pion SDS, Chesnais CB, Weil GJ, Fischer PU, Missamou F, Boussinesq M. Effect of 3 years of biannual mass drug administration with albendazole on lymphatic filariasis and soil-transmitted helminth infections: a community-based study in Republic of the Congo. *Lancet Infect Dis.* 2017;17(7):763-9.
20. Okoyo C, Nikolay B, Kihara J, Simiyu E, Garn JV, Freeman MC, et al. Monitoring the impact of a national school based deworming programme on soil-transmitted helminths in Kenya: the first three years, 2012 - 2014. *Parasit Vectors.* 2016;9(1):408.
21. Levecke B, Anderson RM, Berkvens D, Charlier J, Devleeschauwer B, Speybroeck N, et al. Mathematical inference on helminth egg counts in stool and its applications in mass drug administration programmes to control soil-transmitted helminthiasis in public health. *Adv Parasitol.* 2015;87:193-247.
22. Bharti B, Bharti S, Khurana S. Worm Infestation: Diagnosis, Treatment and Prevention. *Indian J Pediatr.* 2018;85(11):1017-24.
23. Carneiro MB, Avelar BR, Archanjo AB, Martins IVF, Nunes LC, Scott FB. Microscopic alterations in *Fasciola hepatica* from sheep treated with albendazole. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2019;28(1):33-9.
24. Bosch F, Palmeirim MS, Ali SM, Ame SM, Hattendorf J, Keiser J. Diagnosis of soil-transmitted helminths using the Kato-Katz technique: What is the influence of stirring, storage time and storage temperature on stool sample egg counts? *PLoS Negl Trop Dis.* 2021;15(1):e0009032.
25. Lamberton PH, Kabatereine NB, Oguttu DW, Fenwick A, Webster JP. Sensitivity and specificity of multiple Kato-Katz thick smears and a circulating cathodic antigen test for *Schistosoma mansoni* diagnosis pre- and post-repeated-praziquantel treatment. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(9):e3139.
26. Mbong Ngwese M, Prince Manouana G, Nguema Moure PA, Ramharter M, Esen M, Adégnika AA. Diagnostic techniques of soil-transmitted helminths: impact on control measures. *Trop Med Infect Dis.* 2020;5(2).
27. Liu C, Lu L, Zhang L, Bai Y, Medina A, Rozelle S, et al. More poop, more precision: improving epidemiologic surveillance of soil-transmitted helminths with multiple fecal sampling using the Kato-Katz technique. *Am J Trop Med Hyg.* 2017;97(3):870-5.
28. Carvalho GL, Moreira LE, Pena JL, Marinho CC, Bahia MT, Machado-Coelho GL. A comparative study of the TF-Test®, Kato-Katz, Hoffman-Pons-Janer, Willis and Baermann-Moraes coprologic methods for the detection of human parasitosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012;107(1):80-4.
29. Gonçalves AQ, Abellana R, Pereira-da-Silva HD, Santos I, Serra PT, Julião GR, et al. Comparison of the performance of two spontaneous sedimentation techniques for the diagnosis of human intestinal parasites in the absence of a gold standard. *Acta Trop.* 2014;131:63-70.
30. Tello R, Terashima A, Marcos LA, Machicado J, Canales M, Gotuzzo E. Highly effective and inexpensive parasitological technique for diagnosis of intestinal parasites in developing countries: spontaneous sedimentation technique in tube. *Int J Infect Dis.* 2012;16(6):e414-6.
31. Azevedo EP. Diagnóstico coproparasitológico em laboratório de análises clínicas: comparação de técnicas e custo de implantação. Rio de Janeiro [Graduação em Biomedicina] – Universidade Federal Fluminense; 2016.
32. Cools P, Vlamincx J, Albonico M, Ame S, Ayana M, José Antonio BP, et al. Diagnostic performance of a single and duplicate Kato-Katz, Mini-FLOTAC, FECPAKG2 and qPCR for the detection and quantification of soil-transmitted helminths in three endemic countries. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019;13(8):e0007446.