RESEARCH ARTICLE

Factors Associated with Seroprevalence of *Orientia tsutsugamushi* Infection in Rats in Khon Kean Province

Wansane Toanan[1*] Sompoth Weerakhun[2] Kanit Chukanhoom[2] Peerapol Sukon[3] and Piyawat Saipan[4]

Abstract

Objective - To find association between seroprevalence of *Orientia tsutsugamushi* among rats in Khon Kaen province and factors including species of rat, ectoparasitic infestation, and endemicity of human scrub typhus disease in habitats.

Materials and Methods - Endemic and non-endemic areas of scrub typhus disease were randomly selected in Khon Kaen province, according to medical records in humans during 2010-2012. Serum samples were collectd from rats to find *O. tsutsugamushi* antibody by Indirect Immunofluorescent Assay from November 2012 to March 2013

Results - The seroprevalence of *O. tsutsugamushi* infection in Bandicoot rats (*Bandicota* spp.) was 39.04% (9/23) and 50.00% (12/24) in Roof rats (*Rattus* spp.) 6.68% (20/299) in Mice (*Mus musculus*) and 0.00% (0/23) in Asian house shrews (*Suncus murinus*). The seroprevalence of antibody to *O. tsutsugamushi* in ectoparasite-infested rats was 13.26% (24/181) and significantly higher than that of non infested rats (9.04%; 17/188) ($p<0.05$). The seroprevalence of antibody to *O. tsutsugamushi* in rats in endemic areas was 8.95% (17/190) and not different from that of non-endemic areas (13.41%; 24/179).

Conclusion - The seroprevalence of antibody to *O. tsutsugamushi* was associated with species of rats and ectoparasitic infestation but not associated with endemicity of human scrub typhus disease in habitats.

KKU Vet J. 2014;24(2):187-200. *http://vmj.kku.ac.th*

Keywords: *Orientia tsutsugamushi*, Scrub typhus disease, Rats, Khon Kaen province

[1]Graduate student in Veterinary Public Health Program, [2]Department of Medicine, [3]Department of Anatomy, [4]Department of Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand 40002.

***Corresponding author** E-mail: wansanay@gmail.com

ปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับความชุกทางซีรัมวิทยาของการติดเชื้อ *Orientia tsutsugamushi* ของหนูในจังหวัดขอนแก่น

วันเสน่ห์ โตอนันต์[1*] สมโภชน์ วีระกุล[2] คณิต ชูคันหอม[2] พีระพล สุขอ้วน[3]
และ ปิยวัฒน์ สายพันธุ์[4]

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างความชุกทางซีรัมของการติดเชื้อ *Orientia tsutsugamushi* ของหนูกับชนิดหนู การติดปรสิตภายนอก และพื้นที่เกิดโรคสครับไทฟัสในจังหวัดขอนแก่น

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ สุ่มเลือกพื้นที่เกิดและไม่เกิดโรคสครับไทฟัสในจังหวัดขอนแก่นจากประวัติการพบโรคในคนระหว่าง พ.ศ. 2553 - 2555 เก็บตัวอย่างซีรัมจากหนูมาตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *O. tsutsugamushi* ด้วยวิธี Indirect Immunofluorescent Assay ระหว่างเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2555 ถึงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2556

ผลการศึกษา พบแอนติบอดีต่อเชื้อ *O. tsutsugamushi* ในหนูพุก (*Bandicota* spp.) ร้อยละ 39.04 (9/23) หนูท้องขาว (*Rattus* spp.) ร้อยละ 50.00 (12/24) หนูหริ่ง (*Mus musculus*) ร้อยละ 6.68 (20/299) และหนูผี (*Suncus murinus*) ร้อยละ 0.00 (0/23) พบผลบวกต่อการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *O. tsutsugamushi* ในหนูที่ติดปรสิตภายนอกร้อยละ 13.26 (24/181) ซึ่งสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับหนูที่ไม่ติดปรสิตภายนอกที่ร้อยละ 9.04 (17/188) และพบผลบวกต่อการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *O. tsutsugamushi* ของหนูในพื้นที่เกิดโรคสครับไทฟัสร้อยละ 8.95 (17/190) ซึ่งไม่แตกต่าง ($p>0.05$) จากพื้นที่ที่ไม่เกิดโรคสครับไทฟัสซึ่งพบร้อยละ 13.41 (24/179)

ข้อสรุป ความชุกทางซีรัมของแอนติบอดีต่อเชื้อ *O. tsutsugamushi* มีความสัมพันธ์กับชนิดของหนูและการติดปรสิตภายนอกของหนู แต่ไม่สัมพันธ์กับพื้นที่เกิดโรคสครับไทฟัส

วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 2557;24(2):187-200. *http://vmj.kku.ac.th*

คำสำคัญ: เชื้อ *Orientia tsutsugamushi* โรคสครับไทฟัส หนู จังหวัดขอนแก่น

[1]นักศึกษาปริญญาโท สาขาวิชาสัตวแพทย์สาธารณสุข, [2]ภาควิชาอายุรศาสตร์, [3]ภาควิชากายวิภาคศาสตร์, [4]ภาควิชาสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

***ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ** อีเมล์: wansanay@gmail.com

บทนำ

เชื้อริกเกตเซีย *Orientia tsutsugamushi* เป็นเชื้อก่อโรคไข้รากสาดใหญ่จากป่าละเมาะ หรือสครับไทฟัส (Scrub typhus) โรคนี้แพร่เชื้อมาจากสัตว์ (zoonosis) โดยเฉพาะสัตว์ตระกูลฟันแทะ เช่น กระแต กระจ้อน หนู โดยสัตว์ฟันแทะจะไม่แสดงอาการทางคลินิก (inapparent infection) โรคนี้ติดต่อจากสัตว์ตัวหนึ่งไปอีกตัวหนึ่งได้โดยถูกไรอ่อน (chigger) ที่มีเชื้อกัด ไรอ่อนอาศัยเกาะกินน้ำเหลือง หรือน้ำเลี้ยงเซลล์ หรือเลือด ซึ่งโดยทั่วไปจะอยู่ในรูหูของหนู คนมักจะเป็นโฮสต์โดยบังเอิญเมื่อถูกไรอ่อนกัด ระยะฟักตัวของโรคอาจแตกต่างกันได้ตั้งแต่ 6-21 วัน โดยปกติ 10-12 วัน [1] ลักษณะอาการเฉพาะของโรค คือ ผิวหนังที่ถูกตัวไรกัดมักเป็นแผลบุ๋มสีดำ ลักษณะคล้ายแผลถูกบุหรี่จี้ (eschar) ซึ่งพบอยู่นานประมาณ 6-18 วัน พบได้ประมาณร้อยละ 30-40 ต่อมาผู้ป่วยจะมีอาการไข้สูง ปวดศีรษะมาก คลื่นไส้ อาเจียน หูอื้อ เหงื่อออก หนาวสั่น ปวดเมื่อยตามตัว เมื่อเอ็กซเรย์ปอดพบการอักเสบของเนื้อปอด ส่วนใหญ่เป็นแบบ interstitial infiltration แต่มีบางรายจะมีความรุนแรงและกลายเป็นแบบ alveolar infiltration รายที่มีอาการรุนแรงจะเกิดการอักเสบทั่วร่างกาย ไตวาย ตับวาย เยื่อหุ้มสมองหรือสมองอักเสบ [2-4] คนไข้ที่ป่วยด้วยโรคนี้ส่วนใหญ่มาโรงพยาบาลด้วยอาการไข้ไม่ทราบสาเหตุ และมีอาการทางคลินิกคล้ายกับโรคติดเชื้อชนิดอื่นที่ทำให้เกิดไข้สูง เช่น มาลาเรีย เลปโตสไปโรซิส หรือไข้เลือดออก

โรคสครับไทฟัสพบได้ในเอเชียกลาง เอเชียตะวันออก เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ตั้งแต่ไซบีเรียตะวันออกเฉียงใต้ และตอนเหนือของญี่ปุ่น ไปจนถึงตอนเหนือของออสเตรเลีย และวานูอาตู ทางตะวันตกถึงปากีสถาน และยังพบโรคนี้ได้ในพื้นที่สูง 10,000 ฟุต เหนือระดับน้ำทะเลบนเทือกเขาหิมาลัย [1, 5-6] ทั่วโลกมีคนป่วยด้วยโรคสครับไทฟัสจำนวนมาก มีประชากรมากกว่า 1,000 ล้านคนที่มีอัตราเสี่ยงต่อการติดโรคนี้ที่ทำงานในทุ่งนาและในป่า [7-8] สำหรับประเทศไทย ปี พ.ศ. 2554 สำนักระบาดวิทยาได้รับรายงานผู้ป่วยโรคสครับไทฟัสจำนวน 7,310 ราย คิดเป็นอัตราป่วย 11.43 ต่อประชากรแสนคน เสียชีวิต 3 ราย คิดเป็นอัตราตาย 0.01 ต่อประชากรแสนคน ซึ่งพบว่าอัตราป่วยเริ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องแต่เปลี่ยนแปลงไม่มากนัก จาก 0.21 ต่อประชากรแสนคน และสูงขึ้นมากในปี พ.ศ. 2544 เป็น 8.20 ต่อประชากรแสนคน หลังจากนั้น เริ่มลดลงติดต่อกัน 4 ปี เป็น 4.71 ต่อประชากรแสนคนในปี พ.ศ. 2548 ต่อมาอัตราป่วยกลับสูงขึ้นอีกอย่างต่อเนื่อง จนขึ้นสูงสุดในปี พ.ศ. 2554 โรคนี้พบได้ตลอดทั้งปี แนวโน้มในแต่ละปีคล้ายคลึงกัน โดยมักพบผู้ป่วยมากในช่วงฤดูฝน ช่วงประมาณเดือนพฤษภาคมถึงเดือนสิงหาคม ภาคเหนือพบมีผู้ป่วยมากที่สุด รองลงมาได้แก่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคใต้ และภาคกลาง มีอัตราป่วย 37.28, 8.74, 8.50 และ 1.25 ต่อประชากรแสนคนตามลำดับ ในปี 2554 พบผู้ป่วยเพศชายมากกว่าเพศหญิง เพศชาย 4,321 ราย เพศหญิง 2,989 ราย อัตราส่วนเพศหญิงต่อชาย เท่ากับ 1:1.4 พบผู้ป่วยได้ทุกกลุ่มอายุ กลุ่มอายุที่พบจำนวนผู้ป่วยมากที่สุด คือ 35-44 ปี ร้อยละ 17.37 รองลงมาคือ 45-54 ปี

ร้อยละ 16.68 พื้นที่การเกิดโรคสครับไทฟัสนั้นพบว่าส่วนใหญ่ยังคงเป็นพื้นที่เดิมที่เคยมีการระบาด เนื่องจากไรอ่อนเป็นแมลงพาหะนำโรค สามารถถ่ายทอดเชื้อให้กับไรรุ่นลูกผ่านทางไข่ได้ [9]

จึงกล่าวได้ว่าโรคสครับไทฟัสเป็นโรคที่มีความสำคัญ และยังคงต้องมีการเฝ้าระวังให้ได้รับข้อมูลที่ชัดเจน โดยเฉพาะข้อมูลที่ได้จากการสอบสวนโรคที่จะชี้ให้เห็นพื้นที่เกิดโรคและแหล่งรังโรคที่แท้จริง การศึกษาเปรียบเทียบความชุกของเชื้อ *O. tsutsugamushi* ในหนูซึ่งเป็นแหล่งรังโรคในพื้นที่ที่มีรายงานการเกิดโรคอยู่เป็นประจำกับพื้นที่ที่ไม่มีรายงานการเกิดโรคยังไม่มีการศึกษาอย่างจริงจัง การศึกษานี้จึงเป็นประโยชน์ต่องานทางระบาดวิทยา โดยสามารถนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ใช้กับการวางแผนการจัดการกับโรคต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง

1.1. การเลือกสัตว์ทดลอง ใช้การสุ่มจับ ไม่จำกัดชนิดของหนู เพศ พันธุ์ และอายุ โดยวางกรงดักหนูนาน 1-3 คืน แบ่งเป็นบริเวณในบ้านจำนวน 5 กรง และบริเวณรอบบ้านที่เป็นพื้นที่สวน นาข้าว หรือไร่ข้าวโพด จำนวน 5 กรง ตามจำนวนหมู่บ้านและจำนวนสัตว์ทดลองที่ต้องการ ทำการตรวจสอบหนูที่ถูกจับทุกเช้า โดยดัดแปลงวิธีจาก Lerdthusnee et al., 2008 [10]

1.2. ขนาดตัวอย่าง

1.2.1 คำนวณหาจำนวนหมู่บ้านที่ต้องจับหนู

สูตร $N = C2\sigma^2/(\mu_a - \mu_b)^2$ [11]

เมื่อ N = จำนวนหมู่บ้าน

C = ค่าคงที่ เท่ากับ 7.9

σ = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของระดับความชุกในแต่ละพื้นที่เท่ากับ 13.4 [12]

$\mu a - \mu b$ = ผลต่างระหว่างระดับความชุกทางซีรัมของการตรวจพบแอนติบอดีต่อเชื้อ *O. tsutsugamushi* ในหนูในพื้นที่เกิดโรคสครับไทฟัสมาก (จังหวัดเชียงราย ร้อยละ 18) กับพื้นที่ไม่เกิดโรคหรือเกิดน้อย (จังหวัดนนทบุรี ร้อยละ 1) [13]

แทนค่า $N = (7.9)(2)(13.4)^2/(17)^2$

$N = 9.81$

ดังนั้น ต้องจับหนูในพื้นที่มีและไม่มีการเกิดโรคสครับไทฟัส พื้นที่ละ 9-10 หมู่บ้าน

1.2.2 คำนวณหาจำนวนหนูที่ต้องจับในแต่ละหมู่บ้าน

สูตร $N = (1.96)^2 P (100-P)/L^2$ [14]

เมื่อ N = จำนวนหนูในแต่ละหมู่บ้าน

P = ความชุกของหนูที่มีแอนติบอดีต่อเชื้อ *O. tsutsugamushi* เท่ากับ ร้อยละ 5 (โดยคำนวณค่าเฉลี่ยจากจังหวัดนนทบุรี ร้อยละ 1 กรุงเทพฯ ร้อยละ 11 และ สุโขทัย ร้อยละ 3) [13]

L = ค่าความคลาดเคลื่อน เท่ากับ ร้อยละ 10

แทนค่า $N = (1.96)^2 (5) (100-5)/(10)^2$

$N = 18.25$

ดังนั้น ต้องจับหนู 19 ตัวต่อหมู่บ้าน จึงต้องจับหนูทั้งหมด 2×9×19 = 342 ตัว

1.3 สถานที่เก็บตัวอย่างและทำการวิจัย ใช้ข้อมูลรายงานผู้ป่วยโรคสครับไทฟัส ปี พ.ศ. 2553 – พ.ศ. 2555 (ถึงเดือน กันยายน) ของสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 6 จังหวัดขอนแก่น สุ่มเลือกอำเภอที่มีรายงานการเกิดโรค 3 ปีติดต่อกัน และอำเภอที่ไม่มีรายงานการเกิดโรค อย่างละ 3 อำเภอ ได้แก่ อำเภอมัญจาคีรี อำเภอชุมแพ อำเภอภูผาม่าน ซึ่งเป็นพื้นที่มีรายงานการเกิดโรค 3 ปีติดต่อกัน และอำเภอบ้านแฮด อำเภอแวงใหญ่ และอำเภอบ้านฝาง ซึ่งเป็นพื้นที่ที่ไม่มีรายงานการเกิดโรค แล้วสุ่มเลือก 3 หมู่บ้านในแต่ละอำเภอ และสุ่มเลือกบ้าน 4 หลัง ในแต่ละหมู่บ้าน บ้านแต่ละหลังวางกรงดักหนู จำนวน 10 กรง แบ่งเป็นบริเวณในบ้าน ได้แก่ ห้องครัว ห้องนอน ยุ้งข้าว จำนวน 5 กรง และบริเวณรอบบ้านที่เป็นพื้นที่สวน นาข้าว หรือไร่ข้าวโพด จำนวน 5 กรง เท่ากับวางกรงดักหนูทั้งหมด จำนวน 40 กรงต่อหนึ่งหมู่บ้าน ทำการวางกรงดักหนู เมื่อเวลาประมาณ 17.00 น. และเก็บกรงเมื่อเวลาประมาณ 07.00 น. ของวันถัดมา จนได้หนูครบตามจำนวนที่ต้องการ

2. วิธีการเก็บตัวอย่าง

หนูที่ดักจับได้จะนำมาทำให้สลบด้วยการดมยาสลบไอโซฟลูเรนในกล่องใสที่สังเกตอาการของสัตว์ได้ แล้วทำการเจาะเก็บเลือดจากหัวใจปริมาณ 1 มิลลิลิตร เพื่อนำไปปั่นแยกเอาซีรัมไปตรวจทางห้องปฏิบัติการ สำหรับการหาตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *O. tsutsugamushi* นอกจากนี้ยังใช้หวีซี่ละเอียดแปรงขนสัตว์เพื่อสำรวจหาปรสิตภายนอก [15] โดยขั้นตอนการใช้สัตว์ยึดหลักเกณฑ์จรรยาบรรณการใช้สัตว์ของสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และผ่านการพิจารณาเห็นชอบของคณะกรรมการจรรยาบรรณและมาตรฐานการเลี้ยงและการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ลำดับที่ จส.มข. 95/2555 เลขที่ ศธ 0514.1.12.2/107 วันที่ 20 ธันวาคม 2555

3. การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

ตัวอย่างทั้งหมดถูกนำมาตรวจที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยนำซีรัมที่ได้จากหนูมาตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *O. tsutsugamushi* ด้วยวิธี Indirect Immunofluorescent Assay (IFA) ให้แอนติบอดีในซีรัมทำปฏิกริยากับตัวเชื้อ *O. tsutsugamushi*

ในเซลล์เจ้าบ้าน (mouse fibroblast cell) L 929 ที่เคลือบอยู่บนสไลด์แก้ว แล้วเติมแอนติแรทอิมมูโนกลอบูลิน จี ซึ่งติดสลากด้วยสีฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescein Isothiocyanate Conjugate Anti-rat Immunoglobulin G : FITC-conjugate anti-rat IgG) เมื่อนำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์จะเห็นเซลล์ที่ติดเชื้อ *O. tsutsugamushi* ติดสีฟลูออเรสเซนซ์ ตามวิธีของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ตามขั้นตอนดังนี้

3.1 นำสไลด์ IFA จากตู้ -30 องศาเซลเซียส ผึ่งให้แห้งด้วยลมเย็น เจือจางซีรัมที่ต้องการตรวจสอบด้วย PBS ให้ได้ค่าไตเตอร์เท่ากับ 1:50 นำซีรัมที่เจือจางแล้วหยดลงบนสไลด์หลุมๆ ละ 5 ไมโครลิตร (สไลด์ 1 แผ่นมี 21 หลุม) สามารถตรวจตัวอย่างได้ 19 ตัวอย่าง จำนวนที่เหลือใช้ทำ positive control serum 1 หลุม และ negative control serum 1 หลุม

3.2 นำสไลด์ที่หยดซีรัมแล้ววางในกล่องพลาสติกที่มีความชื้น นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที นำสไลด์มาล้างด้วย PBS จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 3-5 นาที ผึ่งสไลด์ให้แห้งด้วยลมเย็น

3.3 หยด FITC-conjugated anti-rat IgG หลุมละ 1 หยด นำสไลด์ที่หยด conjugated แล้ววางในกล่องพลาสติกที่มีความชื้นบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 40 นาที นำสไลด์มาล้างด้วย PBS จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 3-5 นาที ผึ่งสไลด์ให้แห้งด้วยลมเย็น

3.4 หยด Buffered Glycerol Mounting Fluid ลงบนสไลด์แล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ (cover slip) นำสไลด์ไปอ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์

3.5 นำซีรัมที่อ่านได้ผลบวกที่ค่า titer 1:50 มาทำเจือจางต่อให้ได้ดังนี้ คือ 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, และ 1:6400 แล้วดำเนินการตรวจสอบซ้ำดังข้างต้น

3.6 การอ่านผล ค่าของผลบวก (positive) จะพบเชื้อริคเกตเซียติดสีฟลูออเรสเซนซ์ในซัยโตพลาสซึมของเซลล์ มีดังนี้ 4+: พบเชื้อ *O. tsutsugamushi* ติดสีฟลูออเรสเซนซ์สีเขียวเหลืองสว่างสุกใสในซัยโตพลาสซึมของเซลล์ทุกเซลล์ 3+: พบเชื้อ *O. tsutsugamushi* ติดสีฟลูออเรสเซนซ์สีเขียว เหลืองสว่างในซัยโตพลาสซึมของเซลล์ทุกเซลล์ 2+: พบเชื้อ *O. tsutsugamushi* ติดสีฟลูออเรสเซนซ์สีเขียว เหลืองสว่างปานกลางในซัยโตพลาสซึมของเซลล์เกือบทุกเซลล์ 1+: พบเชื้อ *O. tsutsugamushi* ติดสีฟลูออเรสเซนซ์สีเขียว เหลืองอ่อน ในซัยโตพลาสซึมของเซลล์แต่ไม่พบทุกเซลล์ ค่าแอนติบอดีไตเตอร์ (antibody titer) คือหลุมที่อ่านผลได้ที่ 1+ และผลลบ (Negative) จะไม่พบการติดสีฟลูออเรสเซนซ์ในซัยโตพลาสซึมของเซลล์เลย แต่พบเซลล์ติดสีแดงของ Evans blue แทน

4. การจำแนกชนิดของหนูและปรสิตภายนอก

จำแนกชนิดของหนู ปรสิตภายนอก และไรอ่อน ตามระบบอนุกรมวิธานของกรมควบคุมโรคติดต่อ [16] และ Herbreteau et al., 2011 [15] โดยจำแนกเป็น 4 กลุ่ม คือ เห็บ (Ticks) หมัด (Fleas) เหา (Lice) และไร (Mites)

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *O. tsutsugamushi* ในหนูที่ได้จากการศึกษามาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างค่าความชุกของเชื้อ *O. tsutsugamushi* ในหนูกับชนิดของหนู การติดปรสิตภายนอกของหนู และพื้นที่เกิดโรคสครับไทฟัส ด้วยวิธีการวิเคราะห์สถิติไคสแควร์ โดยใช้โปรแกรมคำนวณทางสถิติ SPSS version 19.0 for windows กำหนดระดับความเชื่อมั่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 95% ($p< 0.05$)

ผลการศึกษา

ผลการดักหนู ชนิดของหนู และชนิดของปรสิตภายนอก

จากการวางกรงดักหนูทั้งหมด 2,590 กรง จับหนูได้ทั้งสิ้น 369 ตัว คิดเป็นร้อยละความสำเร็จการดักจับหนู (percent trap success) เท่ากับร้อยละ 14.25 ในพื้นที่ที่มีรายงานการเกิดโรคสครับไทฟัสในคนจับหนูได้รวมจำนวน 190 ตัว แบ่งเป็น อำเภอมัญจาคีรี อำเภอชุมแพ และอำเภอภูผาม่าน จำนวน 64, 50 และ 76 ตัว ตามลำดับ คิดเป็น percent trap success เท่ากับ 11.85, 13.89 และ 16.89 ตามลำดับ หนูที่ดักได้เป็นหนูผีหรือหนูยวง (*Suncus murinus*) จำนวน 9 ตัว หนูพุก (*Bandicota* spp.) จำนวน 7 ตัว หนูท้องขาว (*Rattus* spp.) จำนวน 15 ตัว และหนูหริ่ง (*Mus musculus*) จำนวน 159 ตัว คิดเป็นร้อยละ 4.74, 3.67, 7.89 และ 83.68 ตามลำดับ ผลการดักหนูในพื้นที่ที่ไม่มีรายงานการเกิดโรคในคน จับหนูได้รวมจำนวน 179 ตัว แบ่งเป็นอำเภอบ้านแฮด อำเภอแวงใหญ่ และอำเภอบ้านฝาง จำนวน 63, 65 และ 51 ตัว คิดเป็น percent trap success เท่ากับ 13.70, 15.48 และ 14.17 ตามลำดับ หนูที่ดักได้เป็นหนูผี จำนวน 14 ตัว หนูพุก จำนวน 16 ตัว หนูท้องขาว จำนวน 9 ตัว และหนูหริ่ง จำนวน 140 ตัว คิดเป็นร้อยละ 7.82, 8.94, 5.03 และ 78.21 ตามลำดับ ดังรายละเอียดในตารางที่ 1 และ 2

จากการศึกษาครั้งนี้พบปรสิตภายนอก 5 กลุ่ม ดังนี้ เห็บ ได้แก่ *Haemaphysalis* spp. หมัด ได้แก่ *Xenopsylla cheopis* และ *Echidnophaga gallinacean* เหา ได้แก่ *Polyplax* spp. ไร ได้แก่ *Echinolaelaps* spp., *Dermanyssus* spp. และ *Ornithonyssus* spp. และไรอ่อน (Chigger) ได้แก่ Trombiculidae

Table 1. Percent trap success in endemic and non-endemic areas by districts.

Areas	District	Number of trapped rat/Number of trap (Percent trap success)
Endemic	Mancha Khiri	64/540 (11.85)
	Chum Phae	50/360 (13.89)
	Phu Pha Man	76/450 (16.89)
	Total	190/1,350 (14.07)
Non-endemic areas	Ban Haet	63/460 (13.70)
	Waeng Yai	65/420 (15.48)
	Ban Fang	51/360 (14.17)
	Total	179/1,240 (14.43)
Grand total		369/2,590 (14.25)

Table 2. Rat species in endemic and non-endemic areas.

Areas	Rat species	Trapped rat/All trapped rat (%)
Endemic	*Suncus Murinus*	9/190 (4.74)
	Bandicota spp.	7/190 (3.67)
	Rattus spp.	15/190 (7.89)
	Mus musculus	159/190 (83.68)
Total		190/190 (100.00)
Non-endemic areas	*Suncus Murinus*	14/179 (7.82)
	Bandicota spp.	16/179 (8.94)
	Rattus spp.	9/179 (5.03)
	Mus musculus	140/179 (78.21)
Total		179/179 (100.00)

ผลการตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อ *O. tsutsugamushi* ปรสิตภายนอก และไรอ่อนในหนูพื้นที่เกิดโรคและไม่เกิดโรคสครับไทฟัส

จากการตรวจตัวอย่างซีรัมหนู 369 ตัวอย่าง พบแอนติบอดีต่อเชื้อ *O. tsutsugamushi* ใน 41 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 11.11 โดยพบว่าพื้นที่ที่มีรายงานการเกิดโรคสครับไทฟัสในคน

พบผลบวก 17 ตัวอย่าง จากหนูจำนวน 190 ตัว คิดเป็นร้อยละ 8.95 โดยทั้ง 3 อำเภอ คือ อำเภอมัญจาคีรี อำเภอชุมแพ และอำเภอภูผาม่าน พบผลบวกจำนวน 3, 5 และ 9 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 1.58, 2.63 และ 4.74 ตามลำดับ ขณะที่การเก็บตัวอย่างซีรัมหนูในพื้นที่ที่ไม่มีรายงานการเกิดโรคในคนจาก 179 ตัวอย่าง พบผลบวก 24 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 13.41 โดยอำเภอบ้านฝางไม่มีตัวอย่างที่พบผลบวก ส่วนอำเภอบ้านแฮด และอำเภอแวงใหญ่ พบผลบวกจำนวน 11 และ 13 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 6.14 และ 7.26 ตามลำดับ ผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *O. tsutsugamushi* ด้วยวิธี IFA ของหนูในพื้นที่เกิดโรคและไม่เกิดโรค สครับไทฟัสในคน พบว่าไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) ส่วนการพบปรสิตภายนอกและไรอ่อนของแต่ละพื้นที่ พบว่าพื้นที่เกิดโรคและไม่เกิดโรคสครับไทฟัสมีจำนวนหนูที่พบปรสิตภายนอกคิดเป็นร้อยละ 48.42 และ 49.72 ตามลำดับและไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) และจำนวนหนูที่พบไรอ่อนคิดเป็นร้อยละ 5.79 และ 3.35 ตามลำดับและไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) ดังรายละเอียดในตารางที่ 3

Table 3. Number of Orientia tsutsugamushi antibody positive rats, ectoparasite-infested rats and chigger infested rats by endemic and non-endemic areas in Khon Kaen Province.

Areas	District	*O. tsutsugamushi* antibody positive rats/ All trapped rats (%)	Ectoparasite-infested rats[1]/ All trapped rats (%)	Chigger-infested rats[2]/ All trapped rats (%)
Endemic	Mancha Khiri	3/190 (1.58)	32/190 (16.84)	1/190 (0.53)
	Chum Phae	5/190 (2.63)	24/190 (12.63)	10/190 (5.26)
	Phu Pha Man	9/190 (4.74)	36/190 (18.95)	0/190 (0.00)
	Total	17/190 (8.95)	92 /190 (48.42)	11/190 (5.79)
Non-endemic	Ban Haet	11/179 (6.14)	23/179 (12.85)	0/179 (0.00)
	Waeng Yai	13/179 (7.26)	43/179 (24.02)	0/179 (0.00)
	Ban Fang	0/179 (0.00)	23/179 (12.85)	6/179 (3.35)
	Total	24/179 (13.41)	89 /179 (49.72)	6/179 (3.35)
Grand total		41/369 (11.11)	181/369 (49.05)	17/369 (4.61)

Remark: 1. Four types of ectoparasites; louse, tick, flea and mite, are included.

2. Chigger is in Trombiculidae family, which is scrub typhus vector.

จากตัวอย่างซีรัมหนูที่ให้ผลบวกทั้งหมดจำนวน 41 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างจากหนูที่กำลังป่วยที่ระดับภูมิคุ้มกันมากกว่าและเท่ากับ 1 ต่อ 100 มีจำนวน 24 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 58.54 ของจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก ส่วนตัวอย่างซีรัมหนูที่ระดับภูมิคุ้มกัน 1 ต่อ 50 ถือว่าให้ผลบวก แต่ไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นหนูที่เพิ่งได้รับเชื้ออาจจะกำลังป่วยอยู่ในช่วงระดับภูมิคุ้มกันกำลังขึ้น หรือเป็นหนูที่กำลังหายป่วยอยู่ในช่วงระดับภูมิคุ้มกันกำลังลดลง ดังรายละเอียดในตารางที่ 4

Table 4. *Orientia tsutsugamushi* antibody titers of rats by rat species in endemic and non-endemic areas.

Areas	Rat species	Orientia tsutsugamushi antibody titers						
		1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1,600	1:3,200
Endemic	*Mus musculus*	1	1	0	0	0	0	0
	Bandicota spp.	0	0	0	7	2	0	0
	Rattus spp.	4	0	2	0	0	0	0
	Total	5	1	2	7	2	0	0
Non-endemic	*Mus musculus*	8	6	1	1	1	0	1
	Rattus spp.	3	1	2	0	0	0	0
	Total	11	7	3	1	1	0	1
Grand total (41)		16	8	5	8	3	0	1
Percentage		41.46			58.54			

ผลการตรวจแอนติบอดีเชื้อ *O. tsutsugamushi* ปรสิตภายนอก และไรอ่อนในหนูแต่ละชนิด

ผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *O. tsutsugamushi* ด้วยวิธี IFA ในหนูแต่ละชนิด พบว่า หนูพุก และหนูท้องขาว ให้ผลบวกคิดเป็นร้อยละ 39.04 (9/23) และ 50.00 (12/24) ซึ่งสูงกว่า หนูผีและหนูหริ่ง ที่ให้ผลบวกคิดเป็นร้อยละ 0.00 (0/23) และ 6.68 (20/299) อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ส่วนการพบปรสิตภายนอก (เหา หมัด เห็บ และไร) ในหนูแต่ละชนิดพบว่า หนูผี หนูพุก หนูท้องขาว และหนูหริ่ง มีจำนวนหนูที่พบปรสิตภายนอกคิดเป็นร้อยละ 47.83 (11/23), 56.56 (13/23), 75.00 (18/24) และ 46.49 (139/299) ตามลำดับ และจำนวนหนูที่พบไรอ่อน (Chigger) วงศ์ Trombiculidae คิดเป็นร้อยละ 0.00 (0/23), 8.70 (2/23), 16.67 (4/24) และ 1.67 (5/299) ตามลำดับ โดยจำนวนหนูท้องขาวที่พบปรสิตภายนอกและไรอ่อนสูงกว่าจำนวนหนูหริ่งที่พบปรสิตภายนอกและไรอ่อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังรายละเอียดในตารางที่ 5 และผล

บวกต่อการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *O. tsutsugamushi* ในหนูที่ติดปรสิตภายนอกเท่ากับร้อยละ 13.26 (24/181) สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับหนูที่ไม่ติดปรสิตภายนอกที่ร้อยละ 9.04 (17/188) ดังรายละเอียดในตารางที่ 6

Table 5. Number of *Orientia tsutsugamushi* antibody positive rats, ectoparasite-infested rats and chigger-infested rats by rat species.

Rat species	Amount of *O. tsutsugamushi* antibody positive rats/ All trapped rats (%)	Amount of ectoparasites infested rats[1]/ All trapped rats (%)	Amount of chigger infested rats[2]/ All trapped rats (%)
Suncus Murinus	0/23 (0.00)[*]	11/23 (47.83)[*]	0/23 (0.00)[*]
Bandicota spp.	9/23 (39.04)[b]	13/23 (56.56)[*]	2/23 (8.70)[*]
Rattus spp.	12/24 (50.00)[b]	18/24 (75.00)[a]	4/24 (16.67)[a]
Mus musculus	20/299 (6.68)[a]	139/299 (46.49)[b]	5/299 (1.67)[b]
Total	41/369 (11.11)	181/369 (49.05)	11/ 369 (2.98)

[*] Not included in the analysis

a and b in the same column are significantly different ($p<0.05$)

Remark: 1. Four types of ectoparasites; louse, tick, flea and mite, .are included.

2. Chigger is in Trombiculidae family, which is scrub typhus vector.

Table 6. Number of *Orientia tsutsugamushi* antibody positive rats and ectoparasite- infested rats.

ectoparasite- infested rats	Antibody Titre		
	Positive (%)	Negative (%)	Total
Yes	24 (13.26)[a]	157 (86.74)	181
No	17 (9.04)[b]	171 (90.96)	188
Total	41	328	369

a and b in the same column indicates significant difference ($p<0.05$)

สรุปและวิจารณ์

ผลการตรวจหาแอนติบอดีเชื้อ *O. tsutsugamushi* ของหนูทั้งหมดที่จับได้ในจังหวัดขอนแก่น ด้วยวิธี IFA พบว่า มีความชุกของการติดเชื้อร้อยละ 11.11 เปรียบเทียบกับการศึกษาของ Coleman et al., 2003 [13] ที่ได้รายงานความชุกของการติดเชื้อ *O. tsutsugamushi* ของหนูในจังหวัดกรุงเทพมหานคร เท่ากับร้อยละ 11 ซึ่งเท่ากันกับการศึกษานี้ แต่ต่ำกว่าจังหวัดเชียงราย (ร้อยละ 18) และสูงกว่าจังหวัดสุโขทัย (ร้อยละ 3) และจังหวัดนนทบุรี (ร้อยละ 1) ผลการตรวจหาแอนติบอดีเชื้อ *O. tsutsugamushi* โดยจำแนกตามชนิดหนู พบว่าหนูพุกพบการติดเชื้อร้อยละ 39.04 และหนูท้องขาวร้อยละ 50.00 สูงกว่าหนูผีที่ร้อยละ 0.00 (0/23) และหนูหริ่งที่ร้อยละ 6.68 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลของกรมควบคุมโรคที่กล่าวว่าหนูพุกและหนูท้องขาวเป็นสัตว์รังโรคสครับไทฟัส [16] หนูในพื้นที่เกิดโรคสครับไทฟัสในจังหวัดขอนแก่นให้ผลบวกต่อการตรวจแอนติบอดีเชื้อ *O. tsutsugamushi* เท่ากับร้อยละ 8.95 ซึ่งน้อยกว่าการศึกษาของ อัญชนา และ คณะ (2552) [17] ที่พบว่าพื้นที่เกิดโรค ได้แก่ จังหวัดเชียงราย จังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดชลบุรี และจังหวัดพระนครศรีอยุธยา เท่ากับร้อยละ 100.00, 75.00, 25.45, และ 64.30 ตามลำดับ การศึกษาของ Rodkvamtook et al., 2011 [12] พบว่าจังหวัดชลบุรีเท่ากับร้อยละ 43 และการศึกษาของ นงนุช และคณะ (2554) [2] พบว่าความชุกที่จังหวัดพังงาเท่ากับร้อยละ 63.60 ส่วนหนูในพื้นที่ไม่เกิดโรคสครับไทฟัสในจังหวัดขอนแก่น ให้ผลบวกต่อการตรวจแอนติบอดีเชื้อ *O. tsutsugamushi* เท่ากับร้อยละ 13.41 ซึ่งน้อยกว่าการศึกษาของ อัญชนา และคณะ (2552) [17] ที่พบว่าพื้นที่ไม่เกิดโรคที่อยู่ในอุทยานแห่งชาติภูเรือจังหวัดเลย อุทยานแห่งชาติหมู่เกาะสุรินทร์ จังหวัดพังงา และพื้นที่สาธารณะบนเกาะลันตาจังหวัดกระบี่ เท่ากับร้อยละ 30.80, 13.30 และ 28.60 ตามลำดับ

จำนวนหนูที่พบไรอ่อนในพื้นที่เกิดโรคเท่ากับร้อยละ 4.74 สูงกว่าพื้นที่ไม่เกิดโรคซึ่งพบร้อยละ 1.12 และสอดคล้องกับการศึกษาของ Kuo et al. (2011) และ Ree et al. (1995) [19-20] ที่พบว่าพื้นที่ที่มีอุบัติการณ์ของโรคสครับไทฟัสสูง จะพบสัตว์รังโรคมีไรอ่อนมาก โดยจำนวนหนูท้องขาวพบไรอ่อนเท่ากับร้อยละ 16.67 หนูพุกเท่ากับร้อยละ 8.7 มากกว่าหนูหริ่งซึ่งเท่ากับร้อยละ 1.67 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับการศึกษาของ Rodkvamtook et al. (2011) [12] ดังนั้น ถึงแม้หนูหริ่งซึ่งมีที่อยู่อาศัยใกล้ชิดกับคนเพราะเป็นหนูที่อาศัยอยู่ในบ้านเรือน [16] แต่ก็อาจไม่ใช่ปัจจัยเสี่ยงสูงสุดที่ทำให้คนเป็นโรคสครับไทฟัส เพราะมีการติดไรอ่อนซึ่งเป็นพาหะนำโรคสครับไทฟัสน้อยกว่าหนูพุกและหนูท้องขาว การดักจับหนูในช่วงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2555 ถึงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2556 ซึ่งเป็นช่วงฤดูหนาว และฤดูร้อนจึงพบไรอ่อนในธรรมชาติน้อย สอดคล้องกับการศึกษาของ อัญชนา ประศาสน์วิทย์ และนิสา สิริสุขการ (2548) [18] ที่พบว่าจำนวนไรอ่อนจะมีชุกชุมในฤดูฝน และสามารถเก็บตัวอย่างไรอ่อนในสัตว์รังโรคจำนวนมากที่สุด รองลงมาคือ ฤดูหนาว และฤดูร้อนตามลำดับ และสำนักระบาดวิทยา [9] ยังได้รายงานว่าฤดูฝนมีการ

เกิดโรคสครับไทฟัสสูงกว่าช่วงฤดูอื่นอีกด้วย

จากการสังเกตของผู้ศึกษาพบว่าโดยส่วนใหญ่พื้นที่ที่เก็บตัวอย่างทั้งหมดมีลักษณะเป็นหมู่บ้านที่มีการทำเกษตรกรรมอยู่รอบหมู่บ้าน เช่น ทำนาข้าว ทำไร่อ้อย ไร่มันสำปะหลัง ไร่ข้าวโพด แต่ในพื้นที่เกิดโรคมีลักษณะที่ต่างจากพื้นที่ไม่เกิดโรค คือมีภูเขาและป่าอนุรักษ์อยู่ใกล้ๆ ด้วย ในความคิดเห็นของผู้ทำการศึกษาเห็นว่าลักษณะภูมิประเทศมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคในคนได้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Kuo et al. (2011) [19] ที่พบว่าพื้นที่ที่มีอุบัติการณ์ของโรคสูงมีความสัมพันธ์กับพื้นที่บนเขา เกษตรกรมีอาชีพปลูกข้าวไร่ (นาที่ใช้น้ำน้อย) และในสัตว์รังโรคที่เป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมขนาดเล็กเมื่อนำมาตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *O. tsutsugamushi* พบว่ามีอัตราที่สูง แม้ว่าในการศึกษาครั้งนี้จะไม่พบว่าไรอ่อนมีความสัมพันธ์กับการพบโรคในพื้นที่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ก็ได้พบแนวโน้มว่า โอกาสพบไรอ่อนจะมีมากกว่าในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคนี้ในคน (5.79% เทียบกับ 3.35%)

เอกสารอ้างอิง

1. Department of Disease Control. Definition of inflectious disease Thailand. Bangkok. The Printing of Express Transportation Organization of Thailand; 2003.
2. Chinprasartsak, S. Scrub typhus in Thailand. Nakhon Ratchasima. Somboon Printing; 2003.
3. Jaturabundit, N., Chuntranon, O., Thongkhow, S., Pangpit, S., Akethammasatian, B., Tingjaronepakdee, S., et al. Multi-districts Scrub Typhus Outbreak Investigation in Phang Nga Province, October-November, WESR. 2010; 42(4): 49-56.
4. Sirisanthana, V., Puthanakit, T., and Sirisanthana, T. Epidemiologic, clinical and laboratory features of scrub typhus in thirty Thai children. *Pediatr Infect Dis J.* 2003; 22(4): 341-345.
5. Joseph E.M. and Daniel B.F. Rickettsia tsutsugamushi and Rickettsis akari In: Sherwood. Infectious diseases. Philadelphia: WB Saunders; 1992. p. 1654-7.
6. Silpapojakul, K. Scrub typhus in the Western Pacific region. *Ann Acad Med Singapore.* 1997; 26(6): 794-800.
7. Brown, G.W., Robinson, D.M. and Huxsoll, D.L. Scrub typhus a common of illness in indigenous population. *Tran R Soc Trop Med Hyg.* 1977; 70: 444-448.
8. Rosenberg, R. Drug-resistance scrubtyphus typhus: paradigm and paradox. *Parasitology today.* 1997; 12: 31-32.
9. Bureau of Epidemiology. Annual Epidemiological Surveillence Report 2011 and 2012. [Internet]. [cited 2014 Jul 9]. Available from: http://www.boe.moph.go.th/Annual/Annual%202554/Main.html
10. Lerdthusnee, K., Nigro, J., Monkanna, T., Leepitakrat, W., Leepitakrat, S., Insuan, S., et al. Surveys of rodent-borne disease in Thailand with a focus on scrub typhus assessment. *Integr Zool.* 2008; 3(4): 267-273.
11. Snedecor, G.W., and Cochan, WG. Statistical methods. 8th edition. Lowa state university press. Ames. IA; 1989.

12. Rodkvamtook, W., Ruang-Areerate, T., Gaywee, J., Richards, A. L., Jeamwattanalert, P., Bodhidatta, D., et al. Isolation and characterization of Orientia tsutsugamushi from rodents captured following a scrub typhus outbreak at a military training base, Bothong district, Chonburi province, central Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 2011; 84(4): 599-607.
13. Coleman, R. E., Monkanna, T., Linthicum, K. J., Strickman, D. A., Frances, S. P., Tanskul, P., et al. Occurrence of *Orientia tsutsugamushi* in small mammals from Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 2003; 69(5): 519-524.
14. Lwanga, S.K. and Lemeshow, S. Sample size determination in health studies: A practical manual. World Health Organization. Geneva; 1991.
15. Herbreteau, V., Jittapalapong, S., Rerkamnuaychoke, W., Chaval, Y., Cosson, J.-F., and Morand, S. Potocals for field and laboratory rodent studies. Bangkok: Kasetsart University Press; 2011.
16. Department of Communicable Disease Control. The survey of scrub typhus reservoir host and the identification of Chigger. Bangkok. The Printing of Agricultural Co-operative Federation of Thailand, Limited; 2001.
17. Prasartvit, A., Eamsobhana, P., Rodkvamtook, W. and Sirisukkarn, N. Survey of Infected rate in reservoir host of Scrub Typhus and Detection of Orientia tsutsugamushi in Chigger mite by Polymerase Chain Reaction in Infected areas and Ecotourism areas. 2009. [Internet]. [cited 2014 Jul 9]. Available from: http://www.kmddc.go.th/research/4754
18. Prasartvit, A. and Sirisukkarn, N. The prevelance and Chigger of scrub typhus reservoir by season. *Disease Control Journal.* 2005; 32(3): 211-217.
19. Kuo, C. C., Huang, J. L., Ko, C. Y., Lee, P. F., and Wang, H. C. Spatial analysis of scrub typhus infection and its association with environmental and socioeconomic factors in Taiwan. *Acta Trop.* 2011; 120(1-2): 52-58.
20. Ree, H. I., Cho, M. K., Lee, I. Y., and Jeon, S. H. (). Comparative epidemiological studies on vector/reservoir animals of tsutsugamushi disease between high and low endemic areas in Korea. *Korean J Parasitol.* 1995; 33(1): 27-36.