

Deteksi *Rickettsia* spp. pada Pinjal Tikus di Kota Semarang

Detection of Rickettsia spp. in Rat Fleas in Semarang City

Dyah Widiastuti*, Ulfah Farida Trisnawati, Nova Pramestuti
Balai Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Banjarnegara
Jl. Selamanik No 16 A Banjarnegara, Jawa Tengah, Indonesia
*E_mail: umi.azki@gmail.com

Received date: 03-08-2018, Revised date: 16-11-2018, Accepted date: 29-11-2018

ABSTRAK

Indonesia merupakan negara endemis rickettsiosis, di kota-kota besar seperti Jakarta dan Kota Semarang pernah ditemukan adanya antibodi *Rickettsia typhi* pada manusia. Populasi tikus yang tinggi di Kota Semarang memungkinkan terjadinya penularan rickettsiosis. Rickettsiosis disebabkan oleh *Rickettsia* spp. yang ditularkan melalui ektoparasit tikus. Sistem surveilans rickettsiosis di Kota Semarang belum ada, sehingga adanya infeksi *R. typhi* pada pinjal tikus menjadi tidak dilaporkan. Tujuan dari penelitian ini untuk mendeteksi keberadaan *R. typhi* pada pinjal tikus di Kota Semarang. Pinjal diperoleh dari tikus yang tertangkap dengan metode *live trap* di beberapa lokasi Kota Semarang pada bulan April-November 2016. DNA *Rickettsia* spp. dari sampel pinjal dideteksi menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Hasil penelitian menunjukkan bahwa *Xenopsylla cheopis* menginfestasi semua tikus tertangkap yaitu *Rattus tanezumi*, *R. norvegicus*, *R. exulans*, *Bandicota indica*, *B. bengalensis*, *Mus musculus* dan *Suncus murinus*. Pengujian dengan PCR dilakukan pada sebanyak 144 *pool X. cheopis*, lima puluh *pool* sampel *X. cheopis* (34,7%) positif *Rickettsia* spp. Tidak ada korelasi yang signifikan antara spesies inang dan jenis kelamin inang terhadap infeksi *Rickettsia* spp. pada populasi pinjal. Tingginya *X. cheopis* terinfeksi dengan *Rickettsia* spp. dapat berpotensi menjadi sumber penularan rickettsiosis di Kota Semarang.

Kata kunci: *Rickettsia*, *Xenopsylla cheopis*, penularan, Kota Semarang

ABSTRACT

Indonesia was reported as endemic area of rickettsiosis, antibody anti *Rickettsia typhi* has been detected in human population in Jakarta and Semarang. High population of rats in Semarang might contribute to rickettsiosis transmission. Rickettsiosis is caused by *Rickettsia* spp. which is transmitted by rat ectoparasite. Surveillance system of rickettsiosis in Semarang City has not been established, so the infection of *R. typhi* in rat flea was under reported. The aim of this study were to identify flea species on rats and to investigate the presence of *Rickettsia* spp. infection in fleas pool. The fleas were collected from rodent which were captured using single *live trap* in some areas in Semarang within April-November 2016. *Rickettsia* spp. DNA of these flea samples were detected by polymerase chain reaction. The result showed that *Rattus tanezumi*, *R. norvegicus*, *R. exulans*, *Bandicota indica*, *B. bengalensis*, *Mus musculus* and *Suncus murinus* were infested with *Xenopsylla cheopis*. A total of 144 *X. cheopis* pools were tested. Fifty (34.7%) pools of *X. cheopis* were infected with *Rickettsia* spp. There were no significant correlation between host species and sex toward the infection of *Rickettsia* spp. in fleas population. High infection rate of *Rickettsia* spp. among *Xenopsylla cheopis* population in Semarang City can play a role in transmission of rickettsiosis.

Keywords: *Rickettsia*, *Xenopsylla cheopis*, transmission, Semarang City

PENDAHULUAN

Rickettsiosis adalah penyakit demam akut yang disebabkan oleh bakteri gram negatif intraseluler dari genus *Rickettsia*.¹ Rickettsiosis terdistribusi di seluruh dunia, terutama di negara-negara tropis dan beriklim sedang. Indonesia dilaporkan sebagai negara endemis rickettsiosis.² Antibodi terhadap *R. typhi* pada manusia telah dilaporkan di Jakarta³ dan beberapa wilayah di Kota Semarang.⁴

Rickettsiosis terbagi menjadi tiga golongan utama yaitu golongan *Spotted Fever Group* (SFG), *Typhus Group* (TG), dan *Scrub Typhus*, serta rickettsiosis lain seperti *Q fever*.⁵ Siklus hidup *Rickettsia* di alam melibatkan interaksi antara inang mamalia dan vektor beberapa jenis arthropoda seperti pinjal, caplak, kutu, dan tungau.⁶ Pinjal tikus (*Xenopsylla cheopis*) berperan sebagai vektor dari *murine typhus* (salah satu kelompok dari *typhus group*), sementara *Rattus rattus* dan *R. norvegicus* sebagai inang reservoir.² Meskipun belum banyak dilaporkan infeksi *Rickettsia* pada manusia, namun agen penyebab rickettsiosis telah terdeteksi pada pinjal tikus seperti yang dilaporkan oleh Joharina *et al.*⁶ dan Rakotonanahary *et al.*⁷

Kota Semarang merupakan wilayah dengan kondisi iklim dan ekologi yang mendukung kehidupan vektor dan reservoir dari rickettsiosis. Hasil spot survei Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Tengah tahun 2005 menunjukkan bahwa *trap success* (keberhasilan penangkapan) tikus di Kota Semarang tergolong tinggi yaitu mencapai 74,62%.⁸ Penelitian oleh Gassem *et al.* menunjukkan bahwa 9% (6/67) pasien rawat inap dan 4% (3/70) pasien rawat jalan yang menderita demam akut di rumah sakit yang ada di Kota Semarang terdeteksi positif menderita *Murine typhus*.⁹ *Murine typhus* merupakan jenis rickettsiosis yang disebabkan oleh *Rickettsia typhi*. Sistem surveilans rickettsiosis di Kota Semarang belum ada, sehingga kasusnya menjadi tidak dilaporkan. Salah satu faktor risiko yang dapat berperan dalam penularan rickettsiosis

adalah keberadaan pinjal positif mengandung bakteri *Rickettsia*. Data faktor risiko yang berperan dalam penularan rickettsiosis sangat diperlukan untuk program pengendalian penyakit tersebut. Penularan rickettsiosis dapat terjadi pada semua wilayah termasuk di Kota Semarang, apabila ditemukan vektor dan inang reservoir yang infeksi, serta adanya kontak antara manusia dengan vektor tersebut. Pinjal mendapatkan infeksi dari tikus ketika menghisap darah tikus yang mengandung bakteri *Rickettsia* dalam darahnya.¹⁰ Oleh karena itu, dilakukan penelitian untuk mengidentifikasi spesies pinjal yang menginfestasi tikus dan mendeteksi keberadaan infeksi *Rickettsia* spp. pada pinjal tikus.

METODE

Penelitian dilakukan dengan desain *cross sectional*. Sampel berupa pinjal yang diperoleh dari tikus yang tertangkap dengan metode *live trap* di beberapa lokasi di Kota Semarang yang memiliki riwayat penularan leptospirosis yang tinggi. Pertimbangan pemilihan lokasi didasarkan pada riwayat penularan leptospirosis karena infeksi rickettsiosis belum pernah dilaporkan sebelumnya, dan lokasi yang memiliki riwayat penularan leptospirosis pada umumnya memiliki kepadatan tikus yang tinggi. Lokasi yang dipilih untuk dilakukan penangkapan tikus yaitu wilayah Puskesmas Srandol, Ngesrep, Ngeplak Simongan, Manyaran dan Krobokan. Pengumpulan sampel pinjal tikus dilaksanakan pada Bulan April-November 2016. Pinjal yang diawetkan dalam NaCl (-20°C) dipakai untuk pemeriksaan *Rickettsia*, sedangkan dalam alkohol 70% (suhu ruang) untuk pembuatan spesimen. Total pinjal yang diperiksa sebanyak 144 *pool*. Identifikasi spesies pinjal dilakukan menggunakan kunci dari CDC¹¹ dan Hopkins.¹²

Deteksi *Rickettsia* dilakukan pada pinjal yang diperoleh dari masing-masing tikus. Sebanyak maksimal 10 ekor pinjal yang didapat dari satu inang tikus, dimasukkan ke dalam vial (metode *pooling*). Kemudian

dilakukan isolasi DNA berdasarkan prosedur dalam kit Genomic DNA Mini Kit (*tissue*) dari Geneaid. Reaksi PCR menggunakan *Go taq green master mix* dengan formula 12,5 µl *master mix*, *buffer nuclease-free water* 5,5 µl, primer *forward* dan *reverse* masing-masing 1 µl dan *template* DNA 5 µl. Amplifikasi gen *gltA* dilakukan menggunakan sepasang primer *forward*(RpCS877p)

5'GGGGGCCTGCTCACGGCGG3' dan *reverse*(RpCS1258n)

5'ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA3' dengan target *band* sebesar 381 bp.¹³

Gene block dari primer tersebut digunakan sebagai kontrol positif. *Thermal cycler* dijalankan dengan suhu *pre-denaturation* 95°C selama 5 menit, sebanyak 35 siklus amplifikasi pada suhu 95°C selama 15 detik (*denaturation*), 54°C selama 15 detik (*annealing*), dan 72°C selama 30 detik (*extension*), serta *post-extension* 72°C selama 3 menit.⁶ Produk PCR dielektroforesis dengan gel agarose 2% dan pewarna *florosafe* DNA dengan target pita DNA pada posisi 381 bp.

Analisis data menggunakan uji statistik *chi-square* digunakan untuk melihat hubungan antara jenis kelamin inang dan spesies inang dengan infeksi *Rickettsia* pada pinjal. Apabila syarat pemakaian uji *chi-square* tidak terpenuhi (tidak boleh ada *cell* yang nilai *expected*-nya < 1 atau nilai *expected* < 5 lebih dari 20% total *cell*), maka uji alternatif yang digunakan adalah uji *Fisher's Exact* atau *kolmogorov smirnov*.

HASIL

Spesies pinjal yang menginfestasi tikus yang tertangkap di Kota Semarang (*R. tanezumi*, *R. norvegicus*, *R. exulans*, *B. indica*, *B. bengalensis* dan *S. murinus*) adalah *X. cheopis*. Ciri khusus dari pinjal ini yaitu tidak memiliki sisir genal maupun pronotal dan pada bagian mesotoraks memiliki garis pleural. Pinjal *X. cheopis* betina memiliki spermateka dengan ciri pada bagian hilla panjang, pangkal hilla ramping dan lebih meluas daripada bulga (Gambar 1).



Gambar 1. *Xenopsylla cheopis* Betina yang Diperoleh di Kota Semarang

Infeksi *Rickettsia* spp. pada Pinjal Tikus

Hasil pemeriksaan dengan PCR, jumlah pinjal *X. cheopis* yang terinfeksi *Rickettsia* spp. banyak ditemukan pada *R. tanezumi* dan *R. norvegicus*. Akan tetapi, berdasarkan hasil uji *kolmogorov smirnov* menunjukkan tidak ada hubungan yang signifikan antara spesies inang (tikus) dengan infeksi *Rickettsia* spp. Persentase *pool* positif *Rickettsia* spp. pada pinjal *X. cheopis* yang menginfestasi tikus

jantan dan betina hasilnya hampir sama, serta hasil uji *chi-square* menunjukkan tidak ada hubungan antara jenis kelamin inang dengan infeksi *Rickettsia* spp. (Tabel 1).

Amplifikasi gen *gltA* pada *pooling* pinjal *X. cheopis* dengan kode sampel 128-131, 134-135, dan 137-141 muncul pita DNA sebesar 381 bp. Hal ini menunjukkan *pooling* pinjal tersebut positif mengandung *Rickettsia* spp. (Gambar 2).

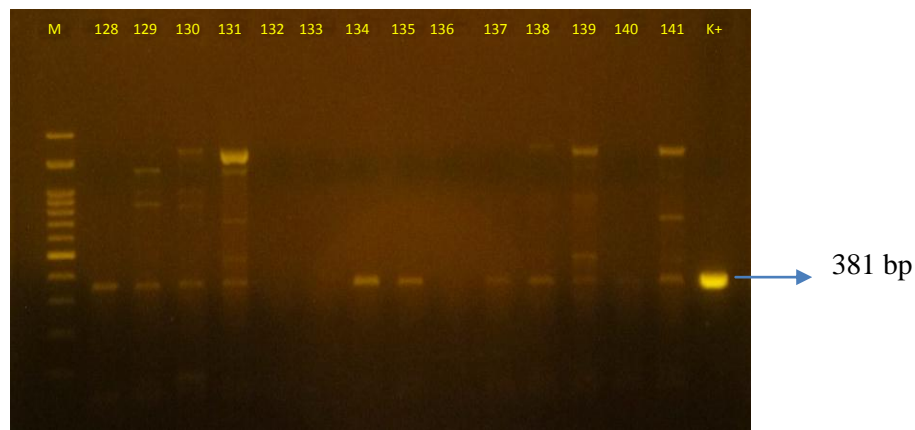
Tabel 1. Infeksi *Rickettsia* spp. pada *X. cheopis*

Karakteristik	Jumlah <i>pool</i> diperiksa	Jumlah <i>pool</i> positif	% <i>pool</i> positif	<i>p-value</i>
Spesies inang:				0,266**
- <i>R. tanezumi</i>	77	21	27,3	
- <i>R. norvegicus</i>	39	21	53,8	
- <i>R. exulans</i>	1	1	1/1	
- <i>B. indica</i>	13	4	30,8	
- <i>B. bengalensis</i>	3	0	0,0	
- <i>Suncus murinus</i>	8	3	37,5	
- <i>M. musculus</i>	3	0	0	
Jenis kelamin inang:				0,531***
- Jantan	64	24	37,5	
- Betina	80	26	32,5	
Total	144	50	34,7	-

Pool : kumpulan pinjal dari 1 ekor tikus per spesies pinjal yang disatukan dalam 1 tabung, 1 *pool* berisi maksimal 10 ekor pinjal

**) : nilai *p-value* dari uji *kolmogorov smirnov*

***) : nilai *p-value* dari uji *chi-square*



Gambar 2. Salah Satu Hasil Elektroforesis Amplifikasi Gen *gltA* *Rickettsia* spp. pada Sampel Pinjal. M: marker, K+: kontrol positif (*gene block*), 128-141: *pooling* sampel pinjal *X. cheopis*, berisi maksimal 10 ekor dalam 1 tabung

Tabel 1 menunjukkan bahwa *X. cheopis* banyak menginfestasi *R. tanezumi*, namun persentase pinjal positif *Rickettsia* spp. terbanyak pada *R. norvegicus*. Hasil PCR pada Gambar 2 menunjukkan bahwa pita DNA dengan ukuran 381 bp ditemukan pada sampel yang positif. Pita DNA yang terbentuk merupakan hasil amplifikasi dari gen *gltA* yang spesifik untuk *Rickettsia* spp.

PEMBAHASAN

Xenopsylla cheopis ditemukan dominan pada setiap tikus yang tertangkap di Kota Semarang. Ektoparasit ini paling sering ditemukan pada tikus yang hidup di daerah tropis dan bersifat kosmopolitan. Beberapa

penelitian melaporkan *R. tanezumi*, *R. exulans*, *Bandicota indica*, dan *R. norvegicus* sebagai inang dari *X. cheopis*.^{14,15}

Persentase pinjal *X. cheopis* positif *Rickettsia* spp. terbanyak pada *R. norvegicus*, namun dari uji statistik menunjukkan infeksi *Rickettsia* pada pinjal tidak berhubungan dengan spesies inang. Hasil penelitian ini berbeda dengan penelitian Pramestuti *et al.* di Banjarnegara bahwa *Rickettsia* spp. paling banyak terdeteksi pada *X. cheopis* yang menginfestasi *R. tanezumi* karena tikus tersebut merupakan inang yang dominan ditemukan.¹⁶ Barbara *et al.* juga melaporkan *R. tanezumi* menjadi inang utama *X. cheopis* yang terinfeksi *R. typhi*. Di Indonesia pada daerah

perkotaan, *R. tanezumi* dan *R. norvegicus* cenderung menjadi inang utama yang mengandung *R. typhi*.¹⁷ Infeksi *Rickettsia* pada pinjal tidak berhubungan dengan jenis kelamin inang. Hal ini didukung oleh penelitian Ibrahim *et al.* bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan *positive rate R. typhi* antara tikus jantan dan betina.¹⁸

Rickettsia merupakan bakteri gram negatif yang hidup secara obligat intraseluler dan dapat menyebabkan penyakit pada manusia. Bakteri ini sepenuhnya hidup dalam sitoplasma sel inang eukariotik.³ Penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Rickettsia (R. typhi)* dan ditularkan oleh pinjal tikus adalah *murine typhus*. *Rickettsia typhi* menginfeksi sel epitel mesenteron pinjal kemudian dikeluarkan melalui feses.¹⁹ Pinjal terinfeksi *Rickettsia* ketika memperoleh makanan selama bakteri tersebut berada dalam darah tikus.¹⁰ Pinjal tetap bisa menularkan *Rickettsia* sepanjang hidupnya dengan tetap menunjukkan kebugaran (*fitness*) yang baik.²⁰ Pinjal yang terinfeksi *R. typhi* menjadi infeksi setelah 10 hari bakteri tersebut berada dalam tubuh pinjal.²¹

Penularan infeksi *R. typhi* ke manusia dapat terjadi melalui beberapa mekanisme antara lain: (i) melalui kontaminasi feses infeksius yang masuk melalui inokulasi kulit baik melalui endapan feses pinjal di lokasi gigitan atau kontaminasi kulit yang rusak atau luka dengan feses atau membran mukosa dan (ii) menghirup feses pinjal infeksius.^{19,22} *Rickettsia typhi* tetap dapat menular dalam feses kering pinjal selama 100 hari.² Selain penularan dari pinjal infeksius ke manusia, penularan juga dapat terjadi antar pinjal itu sendiri yaitu feses induk pinjal yang terinfeksi dapat ditularkan pada anaknya (larva pinjal).²³ Kecepatan penyebaran patogen yang dibawa oleh pinjal ke manusia disebabkan oleh frekuensi pinjal mencari pakan darah dan mobilitasnya yang sangat cepat, kelimpahan tikus yang pernah terinfeksi *R. typhi*.²⁰

Masyarakat diharapkan lebih waspada terhadap penularan rickettsiosis dari pinjal tikus ke manusia dengan ditemukannya infeksi *Rickettsia* spp. pada pinjal tikus di beberapa daerah di Kota Semarang. Data tentang penyakit ini belum pernah dilaporkan baik tingkat puskesmas maupun rumah sakit. Laporan mengenai kasus rickettsiosis selama ini lebih banyak dari hasil penelitian. Hasil penelitian di RSUP Dr. Kariadi Semarang menunjukkan dari 137 pasien demam akut yang tidak terdiagnosis yang diperiksa, 9 pasien (7%) diantaranya terinfeksi *R. typhi*.⁹ Oleh karena itu, skrining rickettsiosis terhadap pasien dengan kasus demam akut yang tidak terdiagnosis perlu dilakukan.

KESIMPULAN

Xenopsylla cheopis merupakan spesies dominan yang ditemukan pada setiap tikus yang tertangkap di Kota Semarang. Tingginya *X. cheopis* yang terdeteksi positif *Rickettsia* spp. terutama pada pinjal yang ditemukan pada inang *R. tanezumi* dan *R. norvegicus* berpotensi menjadi sumber penularan rickettsiosis di Kota Semarang.

SARAN

Skrining rickettsiosis pada pasien dengan kasus demam akut yang tidak terdiagnosis perlu dilakukan. Peran serta masyarakat juga diperlukan dalam mengendalikan tikus di lingkungan rumah dan sekitarnya serta mengendalikan pinjal dengan membersihkan lantai dan membersihkan karpet dengan pengisap debu.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kepala Balai Litbangkes Banjarnegara atas izin dan dukungannya hingga penelitian ini dapat dilaksanakan dengan baik, serta rekan-rekan teknis di Instalasi Entomologi dan Instalasi Mikrobiologi Imunologi dan Biologi Molekuler Balai Litbangkes Banjarnegara atas bantuannya selama pelaksanaan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

1. Siqueira-Batista R, Gazineo J, Gomes A, Miguel P, LA S, Geller M. Human rickettsiosis: an epidemiological and clinical update. *J Trop Dis.* 2016;4(2):205. doi:10.4172/2329-891X.1000205
2. Aung AK, Spelman DW, Murray RJ, Graves S. Rickettsial infections in Southeast Asia: implications for local populace and febrile returned travelers. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;91(3):451-60. doi:10.4269/ajtmh.14-0191.
3. Dennis D, Hadi T, Brown R, Sukaeri S, Leksana B, Cholid R. A survey of scrub and murine typhus in the Ancol section of Jakarta, Indonesia. *Southeast Asian J Trop Med Public Heal [Internet].* 1981 [cited 2018 Oct 10];12(4):574-80.
4. Widiastuti D, Sunaryo, Djati AP, Kesuma AP. Faktor Risiko Infeksi Murine Typhus Di Kota Semarang. Laporan Penelitian. Banjarnegara: Balai Litbangkes Banjarnegara; 2017.
5. Lai CH, Chang LL, Lin JN, Tsai KH, Hung YC, Kuo LL, et al. Human spotted fever group rickettsioses are underappreciated in Southern Taiwan, particularly for the species closely-related to *Rickettsia felis*. *PLoS One.* 2014;9(4). doi:10.1371/journal.pone.0095810.
6. Joharina AS, Mulyono A, Sari TF, Rahardianingtyas E, Putro DBW, Pracoyo NE, et al. *Rickettsia* pada pinjal tikus (*Xenopsylla cheopis*) di daerah Pelabuhan Semarang , Kupang dan Maumere. *Bul Penelit Kesehat.* 2016;44(4):237-44.
7. Rakotonanahary RJL, Harrison A, Maina AN, Jiang J, Richards AL, Rajerison M, et al. Molecular and serological evidence of flea-associated typhus group and spotted fever group rickettsial infections in Madagascar. *Parasites and Vectors.* 2017;10(1):105. doi:10.1186/s13071-017-2061-4.
8. Wahyuni S, Yuliadi. Spot survey reservoir leptospirosis di beberapa kabupaten/kota di Jawa Tengah. *Vektora.* 2010;2(2):140-8.
9. Gasem MH, Wagenaar JFP, Goris MGA, Adi MS, Isbandrio BB, Hartskeerl RA, et al. Murine typhus and leptospirosis as causes of acute undifferentiated fever, Indonesia. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(6):975-7. doi:10.3201/eid1506.081405.
10. Brown L. Rickettsial felis, transmission mechanisms of an emerging flea-borne rickettsiosis (dissertation). 2016 [cited 2018 Jun 22]. Available from: https://digitalcommons.lsu.edu/gradschool_dissertations/2215
11. CDC. Pictorial keys to arthropods, reptiles, birds, and mammals of public health significance. Atlanta, Georgia: CDC; 1946.
12. Hopkins G, Rothschild M. An illustrated catalogue of the Rothschild collection of fleas (Siphonaptera) in the British Museum. Volume I Tungidae and Pulicidae. London: The Trustees of the British Museum; 1953.
13. Scarpulla M, Barlozzari G, Marcario A, Salvato L, Blanda V, De Liberato C, et al. Molecular detection and characterization of spotted fever group rickettsiae in ticks from Central Italy. *Ticks Tick Borne Dis.* 2016;7(5):1052-6. doi:10.1016/j.ttbdis.2016.06.003.
14. Ristiyanto, Handayani FD, Boewono DT, Heriyanto B. Penyakit Tular Rodensia. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press; 2014.
15. Zhao F, Zhang T, Su J, Huang Z, Wu A, Lin G. Genetic differentiation of the oriental rat flea, *Xenopsylla cheopis*, from two sympatric host species. *Parasites and Vectors.* 2018;11(1):343. doi:10.1186/s13071-018-2903-8.
16. Pramestuti N, Umniyati SR, Mulyaningsih B, Widiastuti D. Evidence of *Rickettsia typhi* in rat fleas of various habitat and the potential transmission of murine typhus in Banjarnegara, Central Java, Indonesia. *Indian J Public Heal Res Dev.* 2018;9(8):1548-53. doi: 10.5958/0976-5506.2018.00952.X.
17. Barbara KA, Farzeli A, Ibrahim IN, Antonjaya U, Yuniyanto A, Winoto I, et al. Rickettsial infections of fleas collected from small mammals on four islands in Indonesia. *J Med Entomol.* 2010;47(6):1173-8. doi:10.1603/ME10064.
18. Ibrahim IN, Okabayashi T, Ristiyanto, Lestari EW, Yanase T, Muramatsu Y, et al. Serosurvey of wild rodents for rickettsioses (Spotted Fever, Murine Typhus and Q Fever) in Java Island, Indonesia. *Eur J Epidemiol.* 1999;15(1):89-93.

19. Blanton LS, Walker DH. Flea-borne rickettsioses and Rickettsiae. *Am J Trop Med Hyg.* 2017;96(1):53-6. doi:10.4269/ajtmh.16-537.
20. Laudisoit A, Falay D, Amundala N, Akaibe D, de Bellocq JG, Van Houtte N, et al. High prevalence of *Rickettsia typhi* and *Bartonella* species in rats and fleas, Kisangani, Democratic Republic of the Congo. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;90(3):463-8. doi:10.4269/ajtmh.13-0216.
21. Chareonviriyaphap T, Leepitakrat W, Lerdthusnee K, Chao CC, Ching WM. Dual exposure of *Rickettsia typhi* and *Orientia tsutsugamushi* in the field-collected *Rattus* rodents from Thailand. *J Vector Ecol.* 2014;39(1):182-9. doi:10.1111/j.1948-7134.2014.12085.x.
22. Legendre K, Macaluso K. *Rickettsia felis*: a review of transmission mechanisms of an emerging pathogen. *Trop Med Infect Dis.* 2017;2(4):64. doi:10.3390/tropicalmed2040064.
23. Brown L, Macaluso K. *Rickettsia felis*, an emerging flea-borne rickettsiosis. *Curr Trop Med Rep.* 2016;3:27-39. doi:10.1007/s40475-016-0070-6.
24. Solanki S, Chauhan R, Rahman A, Solanki K. Prevalence of ectoparasites in commensal rats in Dehradun, India. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 2013;2(4):38-41.
25. Buchholz MJ, Dick CW. Ecology of rodent-ectoparasite associations in South-Central Kentucky. *Northeast Nat.* 2017;24(2):97-109. doi:10.1656/045.024.0201.
26. Chotelersak K, Apiwathnasorn C, Sungvornyothin S, Panasoponkul C, Samung Y, Ruangsittichai J. Correlation of host specificity, environmental factors and oriental rat flea abundance. *Southeast Asian J Trop Med Public Heal [Internet].* 2015 [cited 2018 Jul 12];46(2):198-206. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26513922>.

