

ISOLATION OF *BORRELIA BURGDORFERI* — THUNDER BAY DISTRICT, ONTARIO

The Lyme disease (LD) spirochete, *Borrelia burgdorferi*, has been isolated from a black-legged tick, *Ixodes scapularis* (northern populations formerly considered *I. dammini*). This is the first time that a live culture of *B. burgdorferi* has been isolated in the Thunder Bay District.

The tick was removed from the rump of a dog in Thunder Bay, Ontario on 31 October 1995. The dog had never travelled outside the city. During the 2- to 3-week period prior to the removal of the tick, the dog had a cough.

The live tick was forwarded to the Vector-borne Diseases Laboratory, British Columbia Centre for Disease Control (BCCDC), Vancouver, British Columbia for spirochetal analysis. It was positively identified as *I. scapularis*.

Prior to dissection, the fully engorged female tick was surface-sterilized in the laboratory using 10% hydrogen peroxide, followed by 70% isopropyl alcohol. The midgut contents were surgically removed, placed in BSK II culture medium, and incubated at 35° C. Cultures were checked weekly using dark-field microscopy. Within 2 weeks, characteristic motile spirochetes of *B. burgdorferi* were seen.

Polymerase chain reacting (PCR) identified the genes of OspA, 16S rRNA, and HSP60 of *B. burgdorferi* in the isolate. The OspA [31 kilodaltons (kDa)], OspB (34 kDa), OspC (22-25 kDa), P39 (39 kDa), flagellin (41 kDa), HSP60 (60 kDa), and 66 kDa bands were profiled using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. The isolate was further analyzed for plasmid profile; pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) separation of macro-restriction digests (*Mlu*I and *Sma*I) of total DNA was also carried out. A 135 kbp PFGE band, characteristic of *B. burgdorferi* sensu stricto, was detected in the restriction digest. The isolate also reacted with monoclonal antibodies to Osps A-D, Fla, BmpA (P39), GroEL, DNak, P22, and P93⁽¹⁾. Based on the above observations and tests on this isolate, the spirochete is confirmed to be the *B. burgdorferi* sensu stricto.

Blood, drawn from the dog 7 days after the tick was removed, tested negative to the antibodies of *B. burgdorferi* at a private laboratory (Diagnostic Veterinary Systems, Don Mills, Ontario). At 21 and 35 days, more blood samples were drawn and sent to the BCCDC. By this time, the dog had seroconverted and both samples were positive with immunofluorescent assay readings of 1:512 and

ISOLEMENT DE *BORRELIA BURGDORFERI* - DISTRICT DE THUNDER BAY (ONTARIO)

Borrelia burgdorferi, spirochète responsable de la maladie de Lyme (ML), a été isolé à partir d'une tique occidentale à pattes noires, *Ixodes scapularis* (populations du nord auparavant considérées comme appartenant à l'espèce *I. dammini*). C'était la première fois qu'une culture vivante de *B. burgdorferi* était isolée dans le District de Thunder Bay.

Le 31 octobre 1995, la tique a été extraite de la croupe d'un chien, à Thunder Bay (Ontario). Le chien n'était jamais sorti de la ville. Au cours des 2 à 3 semaines précédant l'extraction de la tique, il avait présenté une toux.

La tique vivante a été acheminée au *Vector-borne Diseases Laboratory* du *Centre for Disease Control* de la Colombie-Britannique (BCCDC) à Vancouver (Colombie-Britannique) pour qu'on y procède à la recherche des spirochètes. La tique a été formellement identifiée comme étant *I. scapularis*.

Au laboratoire, la tique femelle entièrement gorgée de sang a été stérilisée en surface, avant la dissection, à l'aide de peroxyde d'hydrogène à 10 %, puis d'isopropanol à 70 %. Le contenu de son intestin moyen a été prélevé par chirurgie, transféré sur le milieu de culture BSK II et incubé à 35 °C. Les cultures ont été examinées une fois la semaine au moyen d'un microscope à fond noir. En moins de 2 semaines, les spirochètes mobiles caractéristiques de *B. burgdorferi* ont été observés.

L'amplification par la polymérase (PCR) a mis en évidence, dans l'isolat, les gènes OspA, ARNr 16S et HSP60 de *B. burgdorferi*. Le profil d'OspA [31 kilodaltons (kDa)], d'OspB (34 kDa), d'OspC (22-25 kDa), de P39 (39 kDa), de la flagelline (41 kDa), de HSP60 (60 kDa) et de bandes à 66 kDa a été établi par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium. L'isolat a en outre été analysé en vue de la détermination de son profil plasmidique; la séparation par électrophorèse en champ pulsé (PFGE) des produits de digestion par des enzymes de macrorestriction (*Mlu*I et *Sma*I) de l'ADN total a également été effectuée. Une bande de 135 kbp à la PFGE, caractéristique de *B. burgdorferi* proprement dit, a été mise en évidence dans le produit de digestion par des enzymes de restriction. L'isolat a également réagi à une épreuve effectuée à l'aide d'anticorps monoclonaux pour les gènes Osp A-D, Fla, BmpA (P39), GroEL, DNk, P22 et P93⁽¹⁾. Les observations et les analyses pratiquées sur cet isolat ont confirmé que le spirochète était bel et bien *B. burgdorferi*.

Un échantillon de sang prélevé chez le chien 7 jours après l'extraction de la tique a été analysé par un laboratoire privé (*Diagnostic Veterinary Systems*, Don Mills (Ontario)) et s'est révélé négatif à l'égard des anticorps dirigés contre *B. burgdorferi*. D'autres prélèvements de sang ont été effectués 21 jours et 35 jours après l'extraction et expédiés au BCCDC. À ce moment-là, il y a avait eu séroconversion chez le chien, et les deux échantillons de sang

1:256, respectively. Using Western blot, the latter two blood sera were positive for antigens for OspA-C, P39, flagellin, HSP60, and 66 kDa band.

On 24 November 1994, a fully engorged *I. scapularis* female was removed from a cat in Thunder Bay. This cat had never left the city. PCR testing was used to determine the presence of *B. burgdorferi* in this dead tick⁽²⁾. Although the cat was destroyed before testing for LD, clinical signs indicated possible infection. It had a skin rash (7 cm X 7 cm) at the site of the tick bite on the back of its neck and suffered from lameness, pruritus, renal and bowel dysfunction, and had become very aggressive towards its owner.

Up to the end of 1995, 98 locations/occurrences across Ontario have been documented where the black-legged tick has been found with no history of significant travel by the hosts. Eighteen of these were reports of the tick on dogs, cats, birds, and humans in the Thunder Bay District. The first specimen was collected in 1982 from a human⁽³⁾.

Based on the adult ticks collected from hosts in this area, early questing activity occurs mid-May to mid-July, with fall questing in October and November. Between 1992 and 1995, six adults were collected in the spring and early summer, which is indicative of overwintering. Total annual snowfall in the Thunder Bay area averages 196 cm and apparently provides a suitable microclimate at the soil surface for *I. scapularis*. The beneficial effect of snowcover was clearly seen in the winter of 1995-96 when the mean air temperature for the period from 19 December to 31 March was -13.9° C (max. + 1.3° C, min. -33.7° C), while the mean temperature at ground level beneath the snow was -0.9° C (max. -0.4° C, min. -2.5° C) (S. Forrester, Department of Biology, Lakehead University: personal communication, 1996). Further studies are needed to determine if all three developmental stages are overwintering in the Thunder Bay area.

Endemic areas in Minnesota and Wisconsin provide a source for the black-legged tick, a primary vector of LD. Migratory birds then transport *I. scapularis* into the Thunder Bay region of Ontario. In the spring of 1995, *I. scapularis* larvae were removed from an American robin (*Turdus migratorius*) and a chipping sparrow (*Spizella passerina*) during bird banding at Thunder Cape on Sibley peninsula⁽⁴⁾. Some ground-frequenting birds and birds carrying immature (larvae or nymphs) ticks act as competent reservoirs for *B. burgdorferi*.

Between 1984 and the end of 1995, a total of 14 LD cases were reported in the Thunder Bay District. Nine had no history of travel. In the same period, a total of 228 cases were reported for all of Ontario (C. LeBer, Public Health Branch, Ontario Ministry of Health: personal communication, 1996).

B. burgdorferi has been discovered in individual *I. scapularis* from several Ontario locations including Kenora⁽⁵⁾, Keewatin, Rainy River, and Point Pelee⁽²⁾. As well, it has been found in a beaver tick (*I. banksi*) at Sault Ste. Marie and a squirrel tick (*I. marxi*) at Palmer Rapids, Renfrew County⁽²⁾. More research is needed to determine if *I. banksi* and *I. marxi* are competent vectors capable of transmitting LD spirochetes to animals and humans.

References

1. Sviat SL, Banerjee SN, Banerjee M et al. *Molecular characterization of Borrelia burgdorferi isolated in Canada*. In: *Proceedings of the VII International Congress on Lyme Borreliosis, 1996 June 16-21. San Francisco, CA. Abstract A025*.
2. Scott JD, Banerjee SN, Christensen CI et al. *Lyme disease vector, Ixodes scapularis, has widespread distribution outside Long Point, Ontario*. Poster presentation at the VIII Annual International Scientific Conference on Lyme Borreliosis, 1995 April 28-29, Vancouver, B.C.
3. Lankester MW, Potter WR, Lindquist EE et al. *Deer tick (Ixodes dammini) identified in northwestern Ontario*. CDWR 1991;17:260, 263.
4. Klich M, Lankester MW, Wu KW. *Spring migratory birds (Aves) extend the northern occurrence of blacklegged tick (Acari: Ixodidae)*. J Med Entomol 1996;33:581-85.

étaient positifs au test d'immunofluorescence, les titres s'établissant respectivement à 1:512 et 1:256. L'épreuve Western blot a mis en évidence les antigènes OspA-C, P39, flagelline, HSP60 et la bande à 66 kDa.

Le 24 novembre 1994, une tique femelle appartenant à l'espèce *I. scapularis* entièrement gorgée de sang a été prélevée chez un chat à Thunder Bay. Ce chat n'avait jamais quitté la ville. On a eu recours à la PCR pour rechercher *B. burgdorferi* chez cette tique morte⁽²⁾. Le chat avait été sacrifié avant qu'on ait déterminé s'il était atteint de la ML, mais il présentait des signes cliniques évocateurs. On observait une plaque érythémateuse (7 cm X 7 cm) centrée sur la piqûre de tique, à l'arrière du cou, et l'animal souffrait de boiterie, de prurit, de troubles rénaux et intestinaux; il était en outre devenu très agressif envers son maître.

À la fin de 1995, on avait signalé à 98 reprises la présence de la tique occidentale à pattes noires chez des hôtes qui n'avaient pas fait de voyage important. Dans 18 cas, cette tique était présente chez des chiens, des chats, des oiseaux et des humains du District de Thunder Bay. Le premier spécimen avait été recueilli en 1982, chez un humain⁽³⁾.

En se fondant sur les tiques adultes prélevées chez des hôtes dans cette région, on peut conclure que la première recherche de nourriture survient entre la mi-mai et la mi-juillet, et la recherche automnale, entre octobre et novembre. Entre 1992 et 1995, six tiques adultes ont été recueillies au printemps et au début de l'été, ce qui indique qu'elles auraient hiverné. À Thunder Bay, la chute de neige annuelle totale s'élève en moyenne à 196 cm, créant ainsi, à la surface du sol, un microclimat convenant à *I. scapularis*. On a clairement observé un effet protecteur de la couche de neige au cours de l'hiver 1995-1996, quand la température moyenne de l'air était de -13,9 °C (max. + 1,3 °C, min. -33,7 °C), alors que la température moyenne au niveau du sol, sous la couche de neige, était de -0,9 °C (max. -0,4 °C, min. -2,5 °C) (S. Forrester, département de biologie, Lakehead University : communication personnelle, 1996). Il y a lieu de mener d'autres études afin de déterminer si la tique hiverne dans la région de Thunder Bay à ses trois stades de développement.

La tique occidentale à pattes noires, principal vecteur de la ML, vient des régions endémiques du Minnesota et du Wisconsin. Les oiseaux migrateurs transportent ensuite *I. scapularis* dans la région de Thunder Bay, en Ontario. Au printemps 1995, des larves d'*I. scapularis* ont été recueillies chez un merle d'Amérique (*Turdus migratorius*) et un bruant familier (*Spizella passerina*) au cours du baguage des oiseaux au cap Thunder, dans la péninsule de Sibley⁽⁴⁾. Certains oiseaux qui se posent au sol et certains oiseaux porteurs de tiques immatures (larves ou nymphes) sont des réservoirs compétents de *B. burgdorferi*.

Entre 1984 et la fin de 1995, 14 cas de ML ont été signalés dans le district de Thunder Bay. Neuf des sujets atteints n'avaient fait aucun voyage. Au cours de la même période, 228 cas ont été dénombrés dans l'ensemble de l'Ontario (C. LeBer, Direction de la santé publique, ministère de la Santé de l'Ontario : communication personnelle, 1996).

B. burgdorferi a été trouvé chez des tiques *I. scapularis* de plusieurs localités de l'Ontario, notamment à Kenora⁽⁵⁾, à Keewatin, à la rivière à la Pluie et à la Pointe-Pelée⁽²⁾. Il a également été mis en évidence chez une tique de castor (*I. banksi*) à Sault Ste. Marie et une tique d'écureuil (*I. marxi*) à Palmer Rapids, comté de Renfrew⁽²⁾. Il convient de procéder à d'autres recherches afin de déterminer si *I. banksi* et *I. marxi* sont des vecteurs compétents capables de transmettre les spirochètes de la ML aux animaux et aux humains.

Références

1. Sviat SL, Banerjee SN, Banerjee M et coll. *Molecular characterization of Borrelia burgdorferi isolated in Canada*. Dans: *Proceedings of the VII International Congress on Lyme Borreliosis, 1996 June 16-21. San Francisco, CA. Abstract A025*.
2. Scott JD, Banerjee SN, Christensen CI et coll. *Ixodes scapularis, le vecteur de la maladie de Lyme, est largement répandu en dehors de la région de Long Point, en Ontario*. Présentation par affiches, VIII^e Conférence scientifique internationale annuelle sur la maladie de Lyme, les 28 et 29 avril 1995, Vancouver, C.-B.
3. Lankester MW, Potter WR, Lindquist EE et coll. *Tiques du chevreuil (Ixodes dammini) trouvées dans le nord-ouest de l'Ontario*. RHMC 1991;17:260, 263.
4. Klich M, Lankester MW, Wu KW. *Spring migratory birds (Aves) extend the northern occurrence of blacklegged tick (Acari: Ixodidae)*. J Med Entomol 1996;33:581-85.

5. Banerjee SN, Christensen CI, Scott JD. *Isolation of Borrelia burgdorferi on mainland Ontario*. CCDR 1995;21:85-6.

Source: S Banerjee, PhD, M Banerjee, PhD, Vector-borne Diseases Laboratory, BCCDC, Vancouver, British Columbia; J Scott, BSc(Agr), President, Lyme Disease Association of Ontario, Fergus, M Lankester, PhD, Department of Biology, Lakehead University, Thunder Bay, J Kubinec, DVM, Fort William Animal Clinic, Thunder Bay, Ontario.

5. Banerjee SN, Christensen CI, Scott JD. *Isolement de Borrelia burgdorferi en Ontario (partie continentale)*. RMTC 1995;21:85-6.

Source : S Banerjee, PhD, M Banerjee, PhD, Vector-borne Diseases Laboratory, BCCDC, Vancouver (Colombie-Britannique); J Scott, BSc(Agr), président, Lyme Disease Association of Ontario (Fergus), M Lankester, PhD, département de biologie, Lakehead University, Thunder Bay, J Kubinec, DVM, Fort William Animal Clinic, Thunder Bay (Ontario).

References

1. CDC. *Lyme disease — United States, 1995*. MMWR 1996; 45:481-84.
2. Bakken JS, Dumler JS, Chen SM et al. *Human granulocytic ehrlichiosis in the upper midwest United States*. JAMA 1994; 272:212-18.

Références

1. CDC. *Lyme disease — United States, 1995*. MMWR 1996;45:481-84.
2. Bakken JS, Dumler JS, Chen SM et coll. *Human granulocytic ehrlichiosis in the upper midwest United States*. JAMA 1994;272:212-18.

Published in: Canada Communicable Disease Report 1996; 22: 138-140.