FIRST ISOLATION OF LYME DISEASE SPIROCHETE, *BORRELIA BURGDORFERI* FROM BLACKLEGGED TICK, *IXODES SCAPULARIS*, COLLECTED AT RONDEAU PROVINCIAL PARK, ONTARIO

The Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi,* has been isolated from blacklegged ticks, *Ixodes scapularis,* collected at Rondeau Provincial Park. The Park is a peninsula located on the north shore of Lake Erie, in Chatham-Kent, and consists of Carolinian hardwood forest. This 3,254 hectare cuspate sandspit was formed by water currents depositing sand over several thousand years. The Park attracts high numbers of birds in the spring.

PREMIER ISOLEMENT DE *BORRELIA BURGDORFERI*, LE SPIROCHÈTE RESPONSABLE DE LA MALADIE DE LYME, CHEZ *IXODES SCAPULARIS*, LA TIQUE À PATTES NOIRES, AU PARC PROVINCIAL RONDEAU EN ONTARIO

Le spirochète qui cause la maladie de Lyme a été isolé chez des tiques à pattes noires, *Ixodes scapularis*, recueillies au Parc provincial Rondeau. Le parc est une péninsule située sur la rive nord du Lac Érié, dans la municipalité de Chatham-Kent, et consiste en une forêt carolinienne de feuillus. Cette sablière en pointe de flèche de 3 254 hectares a été formée par des dépôts laissés par les courants d'eau sur plusieurs milliers d'années. Le parc attire un grand nombre d'oiseaux au printemps.

In the fall of 1998, veterinarians from southwestern Ontario submitted blacklegged ticks that had been removed from dogs which had visited the Park within the previous 3 weeks. One of these dogs had three fully engorged female blacklegged ticks which all laid eggs that developed into viable larvae. Subsequently, during follow-up surveillance on 29 November 1998, a total of 50 adults (25 males, 25 females) were collected by flagging understory vegetation. In April 1999, the British Columbia Centre for Disease Control (BCCDC), the University of British Columbia, and the Lyme Disease Association of Ontario initiated epidemiologic research in the Park to study *I. scapularis*, a competent vector of Lyme disease.

During the summer of 1999, immature (larva, nymph) blacklegged ticks were removed from small mammals most commonly on white-footed mice, *Peromyscus leucopus*. From 5 to 7 November 1999, a total of 108 live adult (52 males, 56 females) blacklegged ticks were collected by flagging various locations throughout the Park. These were sent by courier to the Vector-Borne Diseases Laboratory, BCCDC, Vancouver, British Columbia, for spirochetal analysis.

At BCCDC, the identification of ticks was confirmed. All ticks were surface sterilized using 10% hydrogen peroxide followed by 70% isopropyl alcohol, and transferred to sterile tissue to remove excess water. Ticks were cultured in pools of approximately three adults, according to areas surveyed within the Park. The midgut contents from live ticks were cultured in Barbour-Stoenner-Kelly II medium at 34° C, and cultures were checked weekly by dark-field microscopy. Within 4 days, characteristic motile spirochetes were observed in three cultures.

The isolates were immunostained with monoclonal antibodies for *B. burgdorferi*, namely (OspA (31 kilodalton [kDa]), P39 (39 kDa), and flagellin (41 kDa), and were reactive. Using polymerase chain reaction, DNA amplification of the OspA gene was conducted on the isolates and confirmed positive for *B. burgdorferi*.

Many animals act as hosts in the Park for the three stages (larva, nymph, adult) of blacklegged ticks. The white-footed mouse, *P. leucopus*, is the principal host for larval and nymphal *I. scapularis*. Adult blacklegged ticks are common on the white-tailed deer, *Odocoileus virginianus*, especially in the spring and fall. In North America, *I. scapularis* has been found in over 50 species of mammals and over 55 species of birds[1].

Across Ontario, the blacklegged tick has widespread distribution, and *B. burgdorferi*-positive *I. scapularis* have been found in various locations. Birds act as hosts for immature blacklegged ticks. Some songbirds act as competent reservoirs of *B. burgdorferi*, and are involved in transporting these immature blacklegged ticks to non-endemic areas. During the 1999 spring bird migration, a *B. burgdorferi*-infected *I. scapularis* nymph was removed from a common yellowthroat, *Geothlypis trichas*, on Bon Portage Island, Nova Scotia[2]. This discovery shows that birds are involved in bringing *B. burgdorferi*-infected blacklegged ticks long distances into Canada from the United States of America.

The highest concentration of blacklegged ticks is located on the South Point Trail in the southwest area of the Park. Visitors are advised to walk in the centre of trails, tuck long pants into socks, and wear light coloured clothing (to make ticks more visible). Application of tick repellent on the skin and clothing will help to reduce tick bites. Tick checks after an outing and prompt removal of attached ticks with fine-pointed tweezers are important preventative measures.

Enzootic transmission of *B. burgdorferi* from *I. scapularis* to dogs has been reported at some locations in northern and southern

À l'automne 1998, des vétérinaires du sud-ouest de l'Ontario ont soumis des tiques à pattes noires retrouvées chez des chiens qui avaient visité le parc au cours des 3 semaines précédentes. L'un de ces chiens était porteur de trois tiques à pattes noires femelles complètement gorgées de sang. Elles avaient pondu des oeufs qui s'étaient transformés en larves viables. Par la suite, au cours d'une surveillance de contrôle le 29 novembre 1998, on a recueilli 50 tiques adultes (25 mâles et 25 femelles) au moyen de la technique du morceau de flanelle dans l'étage inférieur de la végétation. En avril 1999, le British Columbia Centre for Disease Control (BCCDC), la University of British Columbia et la Lyme Disease Association of Ontario ont entrepris une recherche épidémiologique dans le parc pour étudier *I. scapularis*, un vecteur compétent de la maladie de Lyme.

Au cours de l'été 1999, des tiques à pattes noires immatures (larves, nymphes) ont été prélevées chez de petits mammifères, le plus souvent des souris à pattes blanches, *Peromyscus leucopus*. Du 5 au 7 novembre 1999, 108 tiques à pattes noires adultes vivantes (52 mâles et 56 femelles) ont été recueillies au moyen de la technique du morceau de flanelle dans divers secteurs du parc. Ces tiques ont été envoyées par messagerie au Vector-Borne Diseases Laboratory, BCCDC, à Vancouver (Colombie-Britannique) pour la recherche de spirochètes.

Au BCCDC, l'identification des tiques a été confirmée. Toutes les tiques ont subi une stérilisation superficielle avec du peroxyde d'hydrogène à 10 % puis avec de l'alcool isopropylique à 70 %, après quoi on les a placées sur un papier stérile pour en retirer l'excédent d'eau. Les tiques ont été mises en culture par groupes d'environ trois adultes, selon le secteur du parc où elles avaient été trouvées. Le contenu intestinal des tiques vivantes a été cultivé dans le milieu Barbour-Stoenner-Kelly II à 34 °C, et les cultures ont été vérifiées chaque semaine par microscopie à fond noir. Au bout de 4 jours, on pouvait observer des spirochètes mobiles caractéristiques dans trois des cultures.

Les isolats ont été immunocolorés avec des anticorps monoclonaux de *B. burgdorferi*, notamment l'OspA (31 kilodaltons [kDa]), le P39 (39 kDa) et la flagelline (41 kDa), et se sont révélés réactifs. On a procédé à l'amplification de l'ADN du gène OspA par PCR sur les isolats et l'on a confirmé qu'il s'agissait de *B. burgdorferi*.

Dans le parc, de nombreux animaux servent d'hôte pour les trois stades (larves, nymphes, adultes) des tiques à pattes noires. La souris à pattes blanches, *P. leucopus*, est l'hôte principal d'*I. scapularis* aux stades larvaire et nymphal. Les tiques à pattes noires adultes sont très répandues chez le cerf de Virginie, *Odocoileus virginianus*, surtout au printemps et à l'automne. En Amérique du Nord, *I. scapularis* a été retrouvé chez plus de 50 espèces de mammifères et plus de 55 espèces d'oiseaux[1].

La tique à pattes noires est très répandue dans tout l'Ontario, et des tiques *I. scapularis* positives pour *B. burgdorferi* ont été trouvées à divers endroits. Les oiseaux sont des hôtes pour les tiques à pattes noires immatures. Certains oiseaux chanteurs sont des réservoirs compétents de *B. burgdorferi* et transportent ces tiques immatures dans des régions non endémiques. Pendant la migration des oiseaux chanteurs de 1999, une nymphe de *I. scapularis* infectée par *B. burgdorferi* a été retirée d'une paruline masquée, *Geothlypis trichas*, sur l'île de Bon Portage, en Nouvelle-Écosse[2]. Cette découverte montre que les oiseaux transportent les tiques à pattes noires infectées par *B. burgdorferi* sur de longues distances et les emmènent au Canada à partir des États-Unis.

La plus forte concentration de tiques à pattes noires se trouve à South Point Trail, dans le secteur sud-ouest du parc. On recommande aux visiteurs de marcher au centre des sentiers, de rentrer leur pantalon dans leurs bas et de porter des vêtements de couleur pâle (afin que les tiques soient plus visibles). L'application d'un insectifuge sur la peau et les vêtements aide à prévenir les morsures de tiques. Le contrôle des vêtements et de la peau après chaque sortie en forêt de même que l'extirpation rapide des tiques à l'aide de pinces à sourcils à pointes fines sont des mesures préventives importantes.

La transmission enzootique de *B. burgdorferi* par *I. scapularis* aux chiens a été signalée dans certains endroits du nord et du sud de l'Ontario[3,4]. Les

Ontario[3,4]. Host dogs were seropositive for Lyme disease using indirect immunofluorescence assay and Western blot testing.

From 1981 to the end of 1998, a total of 280 human cases of Lyme disease were reported in Ontario. Of these cases, 127 patients had no history of out-of-province travel (C. Le Ber, Public Health Branch, Ontario Ministry of Health and Long-Term Care, Toronto; personal communication, 1999).

In an earlier study, seropositive *Peromyscus* spp. have been reported from Rondeau Provincial Park, however, no *B. burgdorferi* was isolated during that period and *I. scapularis* (reported as *I. dammini*) was not found[5].

This is the first report of the isolation of *B. burgdorferi* at Rondeau Provincial Park. Isolation of *B. burgdorferi* and the occurrence of all three stages (larva, nymph, adult) of live *I. scapularis* ticks on mammalian hosts and in the environment confirms the presence of *B. burgdorferi* and the establishment of an *I. scapularis* tick population in the Park. Further studies are required to determine the endemicity of *B. burgdorferi* in small mammals and the immature stages of *I. scapularis*.

Acknowledgements

We wish to thank Richard Hornsby, Park Superintendent, Rondeau Provincial Park, for his co-operation on this study. This research was partly funded by the Lyme Disease Association of Ontario.

References

1. Keirans JE, Hutcheson HJ, Durden LA et al. ***Ixodes (Ixodes) scapularis (Acari: Ixodidae)**; redescription of all active stages, distribution, hosts. geographical variation, and medical and veterinary importance.* J Med Entomol 1996;33:297-318.
2. Morshed MG, Scott JD, Banerjee SN et al. *First isolation of Lyme disease spirochete, **Borrelia burgdorferi**, from blacklegged tick. **Ixodes scapularis**, removed from a bird in Nova Scotia, Canada.* CCDR 1999;25;153-55.
3. Banerjee SN, Banerjee M, Scott J et al, *Isolation of **Borrelia burgdorferi** – Thunder Bay District. Ontario.* CCDR 1996; 22:138-40.
4. Banerjee SN, Banerjee M, Fernando K et al. *Presence of Lyme disease spirochete. **Borrelia burgdorferi**, in the blacklegged tick. **Ixodes scapularis**, in southern Ontario,* CMAJ. In press.
5. Barker IK, Surgeoner GA, Artsob H et al. *Distribution of the Lyme disease vector, **Ixodes dammini (Acari: Ixodidae)**, and isolation of **Borrelia burgdorferi** in Ontario.* Can J Med Entomol 1992;29;1011-22.

Source: *MG Morshed, PhD. RSM(CCM). Head. Vector-Borne Diseases Laboratory. Laboratory Services. BCCDC. Vancouver, B.C.: JD Scott, BSc (Agr.), President. Lyme Disease Association of Ontario, Fergus, Ont.: SN Banerjee, PhD. Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of British Columbia, Vancouver. B.C.; K Fernando, MSc. R Mann, RT. Vector-Borne Diseases Laboratory. Laboratory Services, BCCDC. Vancouver, B.C.; J Isaac-Renton. MD. DPH, FRCP(C), Director, Laboratory Services, BCCDC. Vancouver. B.C.*

chiens hôtes étaient séropositifs pour la maladie de Lyme à l'immunofluorescence indirecte et au Western blot.

Entre 1981 et la fin de 1998, 280 cas de maladie de Lyme ont été recensés chez les humains en Ontario. De ce nombre, 127 n'avaient jamais quitté la province (C. Le Ber, Direction de la santé publique, ministère de la Santé et des Soins de longue durée de l'Ontario [Toronto] : communication personnelle, 1999).

Dans une étude antérieure, des souris séropositives du genre *Peromyscus* ont été signalées dans le Parc provincial Rondeau, toutefois *B. burgdorferi* n'a pas été isolé durant cette période et *I. scapularis* (déclaré sous l'appellation *I. dammini*) n'a pas été trouvé[5].

Il s'agit du premier isolement de *B. burgdorferi* au Parc provincial Rondeau. L'isolement de *B. burgdorferi* et la présence des trois stades (larve, nymphe, adulte) de tiques *I. scapularis* adultes vivantes sur des hôtes mammaliens et dans l'environnement confirme la présence de *B. burgdorferi* et l'établissement d'une population de tiques *I. scapularis* dans le parc. Il faudra effectuer d'autres recherches pour déterminer l'endémicité de *B. burgdorferi* chez les petits mammifères et les stades immatures de *I. scapularis*.

Remerciements

Nous souhaitons témoigner notre reconnaissance à Richard Hornsby, directeur du parc, Parc provincial Rondeau, d'avoir collaboré gracieusement à cette étude. Cette recherche a été financée en partie par la Lyme Disease Association of Ontario.

References

1. Keirans JE, Hutcheson HJ, Durden LA et coll. ***Ixodes (Ixodes) scapularis (Acari: Ixodidae)**: redescription of all active stages, distribution, hosts. geographical variation, and medical and veterinary importance.* J Med Entomol 1996;33:297-318.
2. Morshed MG, Scott JD, Banerjee SN et coll. *Premier isolement du spirochète de la maladie de Lyme, **Borrelia burgdorferi**, chez une tique à pattes noires, **Ixodes scapularis**, retrouvée sur un oiseau en Nouvelle-Écosse, Canada.* RMTC 1999;25;153-55,
3. Banerjee SN, Banerjee M, Scott J et coll. *Isolement de **Borrelia burgdorferi** – district de Thunder Bay (Ontario).* RMTC 1996; 22:138-40.
4. Banerjee SN, Banerjee M, Fernando K et coll. *Presence of Lyme disease spirochete. **Borrelia burgdorferi**, in the blacklegged tick. **Ixodes scapularis**, in southern Ontario.* CMAJ. Sous presse.
5. Barker IK, Surgeoner GA, Artsob H et coll, *Distribution of the Lyme disease vector, **Ixodes dammini (Acari: Ixodidae)**, and isolation of **Borrelia burgdorferi** in Ontario.* Can J Med Entomol 1992;29:1011-22.

Source : *MG Morshed, PhD. RSM(CCM). Head. Vector-Borne Diseases Laboratory, Laboratory Services, BCCDC, Vancouver (C.-B.); JD Scott, BSc (Agr.), président, Lyme Disease Association of Ontario. Fergus (Ont.): SN Banerjee. PhD, Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of British Columbia. Vancouver (C.-B.); K Fernando, MSc, R Mann, RT, Vector-Borne Diseases Laboratory. Laboratory Services. BCCDC. Vancouver (C.-B.); D' J Isaac-Renton, DPH. FRCP(C), Director. Laboratory Services. BCCDC. Vancouver (C.-B.).*

Published in: Canada Communicable Disease Report 2000; 26: 42-44