

## Sposób hodowli obrzeżka gołębiego *Argas reflexus* do celów badawczych

Przedmiotem wynalazku jest sposób hodowli obrzeżka gołębiego *Argas (Argas) reflexus* (Fabricius, 1794) do celów badawczych.

Wynalazek umożliwia prowadzenie hodowli *Argas reflexus* do-pozyskiwania okazów do celów badawczych. Hodowla *Argas reflexus* pozwala na przygotowanie testów diagnostycznych do wykrywania alergenów tego kleszcza. Alergeny te należą do najsilniej działających alergenów w mieszkaniach ludzi.

Synantropijny obrzeżek gołębi - *Argas reflexus* jest przedstawicielem rodziny Argasidae (obrzeżkowatych, kleszczy miękkich), która wraz z kleszczami z rodziny Ixodidae (kleszcze właściwe, kleszcze twarde) i Nuttalliellidae tworzy rząd kleszczy (Ixodida). Obrzeżek gołębi bytuje w gniazdach ptaków, gołębnikach, na strychach i poddaszach domów, skąd przechodzi do mieszkań i atakuje ludzi w nocy podczas snu. Duże populacje tego gatunku kleszcza obserwuje się w aglomeracjach miejskich Europy, gdzie licznie występują gołębie, z którymi obrzeżki są żywicielsko związane.

Pośród innych kleszczy *Argas reflexus* wyróżnia się szczególnymi cechami biologicznymi i fizjologicznymi, które zapewniają im rozwój wewnątrz pomieszczeń i długą (nawet kilkuletnią) przeżywalność w siedliskach bez pobierania pokarmu. Pomiędzy budynkami w obrębie miast i na duże odległości są one przenoszone przez ptaki, głównie gołębie. Ze względu na dłuższe żerowanie larw *Argas reflexus* na gołębiach w porównaniu z innymi stadiami są one prawdopodobnie najważniejszym dyspersyjnym stadium tego gatunku.

Do tej pory nie opracowano skutecznych metod zwalczania obrzeżków. Wiąże się to prawdopodobnie z opornością obrzeżków na powszechnie stosowane akarycydy. Mała efektywność zabiegów zwalczania tych kleszczy przy użyciu znanych substancji chemicznych może wynikać także z ograniczeń technicznych. Obrzeżki ukrywają się w głębokich szczelinach na strychach, poddaszach lub w mieszkaniach, co utrudnia ich zniszczenie podczas zabiegów dezynfekcyjnych.

Obrzeżki gołębie charakteryzuje duża agresywność w stosunku do ludzi nasilająca się wraz z długością ich głodowania, co odnotowuje się przy braku dostępu do źródła pokarmu (np. po wypłoszeniu gołębi ze strychów, podczas prac porządkowych na strychach i renowacji budynków etc.) i/lub w przypadku masowego ich występowania na terenach zurbanizowanych. Liczne przypadki ataków ludzi odnotowywane w wielu europejskich krajach położonych w różnych częściach kontynentu, w tym w Polsce, wskazują na szerokie rozprzestrzenienie obrzeżków.

Składniki śliny wprowadzane podczas żerowania obrzeżków wywołują u ludzi długo utrzymujące się miejscowe zmiany skórne i ogólnoustrojowe reakcje. W miejscu i okolicy żerowania obrzeżków mogą pojawić się: swędzący pęcherzyk, silne zaczerwienienie, zapalne ogniska, powiększenie i ból węzłów chłonnych, pęcherzyki z wydzieliną limfatyczną, zapalenie naczyń chłonnych i obrzęk węzłów chłonnych (m.in. Kemper and Reichmuth 1941, Buczek i Solarz 1994, Veraldi i wsp. 1998, Khoury i Maroli 2004, Buczek et al. 2018).

Obrzeżki indukują silne reakcje nadwrażliwości i wstrząs anafilaktyczny (m.in. Miadonna i wsp. 1982, Hilger i wsp. 2005, Quercia et al. 2005, Kleine-Tebbe i wsp. 2006, Śpiewak i wsp. 2006, Weckesser i wsp. 2010), który może być przyczyną śmierci pacjenta, co opisano w Polsce (Buczek i Solarz 1994). Ogólnoustrojowe reakcje na składniki ich śliny objawiają się pokrzywką, obrzękiem naczynioruchowym, zaburzeniami w układzie krążenia, dusznością, utratą przytomności, objawami żołądkowo-jelitowymi (utrata apetytu, nudnościami, wymiotami, bólami brzucha i biegunką, parciem na stolec) i podwyższeniem temperatury ciała do 39°C (m.in. Kemper and Reichmuth 1941, Manilla and Carluci 1985, Dautel i wsp. 1991).

Cechy fizjologiczne obrzeżków, m.in. nocna aktywność, szybkie pobieranie krwi i związane z tym krótkie przebywanie na żywicielu oraz ukrywanie się w szparach w fazie świetlnej dnia utrudnia identyfikację etiologicznego czynnika zmian skórnych i ogólnoustrojowych u ludzi. Brak poprawnej diagnozy stwarza zagrożenie dla zdrowia, a nawet życia ludzi. W tym kontekście fundamentalne znaczenie ma opracowanie odpowiednich testów diagnostycznych niezbędnych do rozpoznania przyczyny chorobowych objawów u ludzi i do szybkiego podjęcia skutecznej farmakologicznej terapii.

Mało wiadomo o skutkach pasożytowania obrzeżka gołębiego na ptakach, co uniemożliwia ocenę zakresu jego oddziaływania na tych żywicieli. Z nielicznej dostępnej literatury wynika, że obrzeżki gołębie mogą powodować zmiany skórne i wypadanie piór gołębi. Na skutek masowego zaatakowania tych żywicieli może występować anemia prowadząca nawet do śmierci ptaków, zwłaszcza młodych osobników.

Rola obrzeżka gołębiego w epidemiologii chorób inwazyjnych ludzi i ptaków jest wciąż słabo poznana. Brak znajomości metod jego hodowli uniemożliwia pozyskanie różnych stadiów rozwojowych potrzebnych do badań nad transmisją chorobotwórczych czynników. Dotychczas potwierdzono, że *Argas reflexus* może przenosić wirusy z grupy Unkuniemi: Ponteves i Grand Arbaud oraz z grupy B: West Nile i Tahyña, a także riketsje *Coxiella burnetii* wywołujące gorączkę Q (za Dusbabek i Rosicky 1976). W gruczołach ślinowych i jelitach z zalegającą krwią ten obrzeżek może utrzymywać wirusy kleszczowego zapalenia mózgu (Wegner 1976). Wskazuje się też na udział obrzeżka w przenoszeniu czynników chorobotwórczych wywołujących spirochetozę i piroplazmozę ptaków.

Brak wiedzy o sposobie hodowli obrzeżków gołębi uniemożliwia przygotowanie testów diagnostycznych do wykrywania alergenów tego kleszcza. Alergeny te należą do najsilniej działających alergenów w mieszkaniach ludzi. Bez licznych okazów larw, nimf i postaci dorosłych obrzeżka gołębiego nie można także wyprodukować produktów akarobójczych bezpiecznych dla ludzi i środowiska, które mogłyby być wykorzystane do zwalczania tych kleszczy w mieszkaniach i na strychach budynków. Na rynku światowym wciąż nie ma oferty preparatu o repelencyjnym działaniu w odniesieniu do obrzeżka gołębiego.

Opracowanie diagnostycznych testów i produktów o działaniu bójczym i repelencyjnym wymaga badań na dużym materiale biologicznym - larwach, nimfach i postaciach dorosłych obrzeżka, gdyż wszystkie te stadia mogą pasożytować na ludziach. Najczęściej jednak atakują ludzi nimfy, samice i samce *Argas reflexus*.

Dotychczas były opisywane sposoby hodowli niektórych gatunków kleszczy z rodziny Ixodidae (m.in. Patrick i Hair 1975, Koch i Mount 1980, Heyne i wsp. 1987, Jones i wsp. 1988, Slovák i wsp. 2002, Levin i Schumacher 2016, Nuss i wsp. 2017, Almazán i wsp. 2018, Elhachimi i wsp. 2021), które nie mają żadnego zastosowania w odniesieniu do obrzeżków z rodziny Argasidae.

Ze względu na to, że obrzeżki gołębie są obligatoryjnymi hematofagicznymi pasożytami, do utrzymania ich populacji niezbędny jest żywiciel. Alternatywną metodą dla żerowania hematofagicznych stawonogów, w tym kleszczy właściwych (Ixodidae), na żywych zwierzętach jest ich karmienie krwią *in vitro* z wykorzystaniem syntetycznych membran (Waladde i wsp. 1991, Voigt i wsp. 1993, Montes et al. 2002, Krull i wsp. 2017, González i wsp. 2021). Ta metoda nie jest jednak satysfakcjonująca w hodowlach do masowego pozyskiwania kleszczy, a także w niektórych rodzajach badań z udziałem kleszczy. Sztuczne karmienie przez syntetyczną membranę ma bowiem pewne techniczne i fizjologiczne ograniczenia, jak na przykład w ilości krwi pobranej przez kleszcze, co wpływa m.in. na płodność samic i na sukces wylęgu larw, a prawdopodobnie także na inne procesy fizjologiczne. Potrzebna jest także standaryzacja rodzaju membran do karmienia różnych gatunków kleszczy. Nie prowadzono badań nad karmieniem tą metodą obrzeżków Argasidae, w tym także *Argas reflexus*. Z tego względu nie można dokonać jakiegokolwiek oceny przydatności syntetycznych membran w hodowli obrzeżka gołębiego.

W dotychczasowym stanie techniki nie opisano metodyki hodowli obrzeżka gołębiego. Zaledwie w kilku pracach dostępnych w naukowych bazach autorzy podają pewne dane o sposobie pozyskiwania okazów Argasidae (wybranych lub wszystkich stadiów), które dotyczą głównie gatunków z rodzaju *Ornithodoros* (Mango i wsp. 1977, Jones i wsp. 1988, Endris i wsp. 1991) i niektórych przedstawicieli rodzaju *Argas* – *Argas (Persicargas) persicus* (Micks 1951, Khalil 1979, El-Kammah i Abdel-Wahab 1980) i *Argas (Persicargas) arboreus* (Makram i Kaiser 1966). Wymienione gatunki mają preferencje biologiczne i ekologiczne inne niż *Argas (Argas) reflexus*, co wyklucza możliwość wykorzystania tej wiedzy do prowadzenia jego hodowli.

Wiedza o sposobach hodowli obrzeżka gołębiego jest bardzo mała, na co wskazują nieliczne prace o biologii i fizjologii tego gatunku publikowane w światowej literaturze. Większość z nich autorstwa projektodawcy tego patentowego opracowania dotyczy tylko pewnych etapów rozwoju obrzeżków i niektórych ich cech fizjologicznych bez opisu technik hodowlanych (Buczek 1988, 1991a,b,c, 1992, 1992/1993, 1995). W innych nielicznych w skali światowej badaniach, głównie z zakresu ekologii obrzeżków, nie opracowano metod hodowlanych i nie optymalizowano ich warunków. Opierały się one tylko na obserwacjach zachowania obrzeżków podczas ich przetrzymywania w określonych warunkach i/lub badania pewnych cech fizjologicznych obrzeżków (Dautel i wsp. 1991, Dautel i Knülle 1997, 1998). Jedynie z dawnej Czechosłowacji pozyskiwano w warunkach laboratoryjnych różne stadia rozwojowe obrzeżków, ale nie podano metodyki tej hodowli (Dusbabek i Rosicky 1976). Autorzy tej publikacji prowadzili badania na małej liczbie okazów. Według dostępnych danych wykorzystali oni tylko 5 samic, 8 samców i 8 nimf *Argas reflexus*.

Utrzymanie populacji *Argas reflexus* w warunkach laboratoryjnych wymagało opracowania odrębnych procedur postępowania i precyzyjnego określenia warunków hodowli poszczególnych stadiów rozwojowych.

Sposób hodowli obrzeżka gołębiego do masowego ich pozyskania przedstawiony w tym opracowaniu jest oparty na wieloletnich własnych badaniach autorów i obserwacjach behawioru obrzeżków w warunkach naturalnych i laboratoryjnych.

Celem wynalazku jest opracowanie sposobu hodowli obrzeżka gołębiego *Argas reflexus* do celów badawczych, co umożliwi otrzymywanie produktów do zwalczania i odstraszania obrzeżków *Argas reflexus*, testów diagnostycznych do wykrywania przyczyn chorób ludzi i ptaków wywoływanych przez ten gatunek i alergenów, które należą do najsilniej działających alergenów w mieszkaniach ludzi. Rozwiązanie według wynalazku pozwoli na diagnozowanie czynników alergii u ludzi w mieszkaniach, przygotowanie szczepionek zabezpieczających ludzi przed zagrażających zdrowiu i życiu skutkami ukłuć obrzeżków, opracowanie skutecznego produktu bójczego i/lub odstraszającego obrzeżki.

Istotą sposobu hodowli obrzeżka gołębiego *Argas reflexus* do celów badawczych, według wynalazku jest to, że każde stadium rozwojowe obrzeżków najpierw umieszcza się na czas żerowania w szklanym terrarium okolonym fosą wodną utworzoną korzystnie w przezroczystym pojemniku, gdzie fosa wodna sięga co najmniej do  $\frac{1}{4}$  wysokości szklanego terrarium, którego podstawa jest wyposażona w drewniany ramiak ze szczelinami i widocznie ukształtowanymi szczelinami, następnie po okresie żerowania okazy obrzeżków przenosi się do komór hodowlanych korzystnie w postaci naczynek wagowych o średnicy 2,5 – 3,5 cm wyścielonych krążkami z bibuły filtracyjnej, i prowadzi ich rozwój w temperaturze od 20°C do 30°C oraz wilgotności od 10% do 90 % korzystnie 30% - 75% utrzymywanej za pomocą odczynników chemicznych w postaci nasyconych roztworów soli  $ZnCl_2$  lub  $LiCl$  (10%),  $CaCl_2$  (30%),  $Ca(NO_3)_2$  (50%),  $K_2C_4H_4O_6$  (75%) i  $Na_2C_2O_4$  (90%), gdzie dla larw wilgotność wynosi od 30% - 75% korzystnie 30% a temperatura 20 - 30°C korzystnie 25°C, zaś dla nimf i dorosłych 30 - 75% korzystnie 50 - 75%, a temperatura wynosi 15 - 30°C korzystnie 20 - 25°C, przy czym żywicielem obrzeżka gołębiego jest gołąb umieszczany w szklanym terrarium w porze nocnej.

Korzystnie nimfy i dorosłe obrzeżki umieszcza się w terrarium na czas żerowania od 0,5 do 1,5 h, zaś larwy na czas od 4 do 12 dni.

Komory hodowlane korzystnie wyścielone krążkiem z bibuły filtracyjnej zamyka się korkiem z ligniny i/lub siatką o rozmiarze oczek nie większych niż 50  $\mu m$  i umieszcza w szczelnie zamkniętych pojemnikach.

Korzystnie terrarium ma wymiary co najmniej 45 cm x 30 cm x 30 cm

Wynalazek umożliwia hodowlę obrzeżka gołębiego *Argas reflexus* do celów badawczych, dzięki zastosowaniu określonych (optymalnych) warunków hodowli. Pozyskiwanie obrzeżka gołębiego *Argas reflexus* na szerszą skalę umożliwi prowadzenie badań oraz opracowywanie produktów o działaniu bójczym i repelencyjnym, testów diagnostycznych do wykrywania czynników chorób ludzi i ptaków. Ponadto rozwiązanie według wynalazku pozwoli na identyfikację alergenów w mieszkaniach i diagnozowanie alergii u ludzi, przygotowanie szczepionek chroniących ludzi przed skutkami ukłuć obrzeżków, opracowania produktu do zwalczania i/lub odstraszania obrzeżków w mieszkaniach.

Rozwiązanie według wynalazku, przedstawione jest w poniższym przykładzie wykonania.

**Przykład:**

Do celów badawczych wybrano okazy obrzeżka gołębiego *Argas reflexus*, które umieszczono na czas żerowania w szklanym terrarium o wymiarach 45x30 cm okolonym fosą wodną utworzoną korzystnie w przezroczystym pojemniku, gdzie fosa wodna sięgała do ¼ wysokości szklanego terrarium. Podstawa terrarium wyposażona została w drewniany ramiak ze szczelinami i widocznie ukształtowanymi szczelinami. Żywicielem obrzeżka gołębiego był gołąb umieszczany w szklanym terrarium w temperaturze pokojowej, w porze nocnej, po 3 godzinach od zapadnięcia zmroku. Każde stadium rozwojowe umieszcza się na gołębiu na czas żerowania. W przypadku nimf i postaci dorosłych na czas 1,5 godzin, zaś larw na okres 12 dni. Po zakończeniu żerowania samice i samce obrzeżka gołębiego przy użyciu pensety przeniesiono do szczelnie zamkniętych szalek Petriego wyścielonych krążkami z bibuły filtracyjnej i umieszczono w szczelnie zamkniętych pojemnikach z wilgotnością 30% i przetrzymywano w temperaturze 25°C w ciemności. Wilgotność 30% utrzymywano poprzez użycie nasyconych roztworów soli CaCl<sub>2</sub> (30%). W celu zapewnienia zaplemnienia samic umieszczono w jednej szalce okazy obydwu płci. Przykład zestawu hodowlanego przewiduje proporcję osobników dorosłych do efektywnego zaplemnienia samic i pozyskania jaj w zakresie od 4:1 do 1:1. Proporcja 1:1 okazała się szczególnie korzystna. Po okresie 19 dni samice przeniesiono do komór hodowlanych w postaci naczynek wagowych korzystnie o średnicy 3,0 cm wyścielonych krążkami z bibuły filtracyjnej i prowadzono ich rozwój w temperaturze 25°C - 30°C oraz wilgotności 30% - 75%.

W drugim etapie hodowli pozyskano larwy *Argas reflexus*. Cel ten osiągnięto poprzez przetrzymywanie składek jaj w komorach hodowlanych w temperaturze 25°C i wilgotności 30%, aż do wylęgu z nich larw, które rozwinęły się w okresie 4 tygodni.

W trzecim etapie hodowli, aby pozyskać nimfy I stadium, niezbędne było karmienie larw na gołębiu przez czas 10 dni. Najwięcej nakarmionych larw uzyskano po 8 dniach od umieszczenia na gołębiu. Długo trwające obserwacje ujawniły, że za gotowe do żerowania larwy można uznać okazy grupujące się na korkach z ligniny, którymi są zamknięte komory hodowlane.

Larwy przetrzymywano w temperaturze 25°C i wilgotności 30% do 75% aż do ich przekształcenia się w następne stadium rozwojowe, tj. w nimfy I stadium. Odpowiednim wyborem okazała się temperatura 25°C i wilgotność 75% oraz warunki fazy ciemnej (24:0).

W czwartym etapie hodowli z nimf I stadium uzyskano nimfy II stadium w okresie 6 tygodni w temperaturze 25°C i wilgotności 65%.

W piątym etapie hodowli z nimf II stadium uzyskano osobniki dorosłe samice i samce w okresie 6 tygodni w temperaturze 25°C i wilgotności 65%.

## Literatura

Almazán, C., Bonnet, S., Cote, M., Slovák, M., Park, Y., Šimo, L. A Versatile Model of Hard Tick Infestation on Laboratory Rabbits. *J. Vis. Exp.* 2018, (140), e57994.

Buczek A. Studies on the biology of *Argas (A.) reflexus* (Fabricius, 1794) (Acari: Ixodida: Argasidae). I. Effect of temperature and relative humidity on embryonic development and egg hatch. *Folia Biol. (Krakow)*. 1988, 36(3–4), 239–263.

Buczek A. Aggregation pheromones in adult forms of *Argas (A.) reflexus* (Fabricius, 1794) (Acari: Ixodida: Argasidae). *Ann. Acad. Med. Siles.* 1991a, 23, 137–141 (in Polish).

Buczek A. Disturbances in larval hatch in *Argas (Argas) reflexus* (Fabricius, 1794) (Acari: Ixodida: Argasidae) caused by the influence of various thermal and humidity conditions. *Wiad. Parazytol.* 1991b, 37(1), 35–40.

Buczek A. Influence of high relative humidity on course of embryonic development and egg hatch of *Argas (A.) reflexus* (Fabricius, 1794) (Acari: Ixodida: Argasidae). *Z. Angew. Zool.* 1991c, 4, 339–443.

Buczek A. Studies on the biology of *Argas (A.) reflexus* (Fabricius, 1794) (Acari: Ixodida: Argasidae). 2. Effect of altering temperatures on embryonic development and egg hatch. *Folia Biol. (Krakow)*. 1992, 40(3–4), 151–153.

Buczek A. Effect of low temperature on the embryonic development and egg hatch of *Argas (A.) reflexus* (Fabricius, 1794) (Acari: Ixodida: Argasidae). *Z. Angew. Zool.* 1992/1993, 2, 249–254.

Buczek A. Disturbances of embryonic development and egg hatch of *Argas (A.) reflexus* (Fabricius, 1794) (Ixodida: Argasidae) caused by altering temperatures. In: Kropczyńska D, Boczek J, Tomczyk A, editors. *The Acari. Physiological and ecological aspect of Acari- host relationships*. Publishing House Dabor, Warszawa; 1995, p. 351–355.

Buczek A., Bartosik K., Kulina D., Raszewska-Famielec M., Borzęcki A. Skin lesions in humans bitten by European pigeon tick *Argas reflexus* (Fab.) (Ixodida: Argasidae) massively occurring in the Upper Silesian conurbation of south-west Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2018, 25(2), 234–240.

Buczek A., Solarz K. Attacks of humans by *Argas (A.) reflexus* (Fabricius, 1794) – dangerous human and animal parasites. *Pol. Tyg. Lek.* 1993, 48(9–10), 238–239 (in Polish).

Dautel H., Kahl O., Knülle W. The soft tick *Argas reflexus* (Acari: Argasidae) in urban environments and its medical significance in Berlin (West). *J. Appl. Entomol.* 1991, 11, 380–390.

Dautel H., Kahl O., Scheurer S., Knülle W. Seasonal activities of the pigeon tick *Argas reflexus* (Acari: Argasidae) in Berlin, Germany. *Folia Parasitol.* 1994, 41, 155–160.

- Dautel H., Knülle W. Life cycle and seasonal development of postembryonic *Argas reflexus* (Acari: Argasidae) at two thermally different location in central Europe. *Exp. Appl. Acarol.* 1997, 12(10), 697–712.
- Dautel H., Knülle W. Seasonal oviposition and temperature requirements of eggs may limit northern distribution of European *Argas reflexus* (Acari: Argasidae). *J. Med. Entomol.* 1998, 35(1), 26–37.
- Dusbábek F, Rosický B. Argasid ticks (Argasidae, Ixodoidea) of Czechoslovakia. *Acta Sci. Nat. Brno.* 1976, 10(7), 1–43.
- El-Kammah K.M., Abdel-Wahab K.S. *Argas (Persicargas) persicus* life cycle under controlled and outdoor conditions. *Acarologia* 1980, 21, 163–172.
- Endris R.G., Haslett T.M., Monahan M.J., Phillips J.G. Laboratory biology of *Ornithodoros (Alectorobius) puertoricensis* (Acari: Argasidae). *J. Med. Entomol.* 1991, 28, 49–62.
- Endris R.G., Haslett T.M., Monahan M.J., Hess W.R., Rutledge L.C. Techniques for mass rearing soft ticks (Acari: Argasidae). *J. Med. Entomol.* 1986, 23(3), 225–229.
- Elhachimi, L., Valcárcel, F., Olmeda, A.S. *et al.* Rearing of *Hyalomma marginatum* (Acarina: Ixodidae) under laboratory conditions in Morocco. *Exp. Appl. Acarol.* 2021, 84, 785–794.
- González J., Bickerton M., Toledo A. Applications of artificial membrane feeding for ixodid ticks. *Acta Trop.* 2021, 215, 105818.
- Heyne H, Elliott E.G.R., Bezuidenhout J.D. Rearing and infection techniques for *Amblyomma* species to be used in heartwater transmission experiments. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 1987, 54, 461–471.
- Hilger C., Bessot J.C., Hutt N., Grigioni F., De Blay F., Pauli G., Hentges F. IgE-mediated anaphylaxis caused by bites of the pigeon tick *Argas reflexus*: cloning and expression of the major allergen Arg r 1. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005, 115(3), 617–622.
- Jones L.D., Davies C.R., Steele G.M., Nuttall P.A. The rearing and maintenance of ixodid and argasid ticks in the laboratory. *Anim. Technol.* 1988, 39, 99–106.
- Kemper H., Reichmuth W. Die Taubenzecke als Parasit des Menschen. *Z. Ang. Entomol.* 1941, 28(2–3), 507–516.
- Khalil G.M. The Subgenus *Persicargas* (Ixodoidea: Argasidae: *Argas*) 31. The life cycle of *A. (P.) persicus* in the laboratory. *J. Med. Entomol.* 1979, 16(3), 200–206.
- Khoury C., Maroli M. The pigeon tick, *Argas reflexus*, and hazard for human health. *Sanita Ann. Ist. Super.* 2004, 40(4), 427–432 (in Italian).
- Kleine-Tebbe J., Heinatz A., Gräser I., Dautel H., Hansen G.N., Kespohl S., Rihs H.P., Raulf-Heimsoth M., Vater G., Rytter M., Hausteil U.F. Bites of the European pigeon tick (*Argas reflexus*): Risk of IgE-mediated sensitizations and anaphylactic reactions. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006, 117(1), 190–195.

- Koch H.G., Mount G.A. Mass Rearing of Lone Star Ticks. *J. Econ. Entomol.* 1980, 73(4), 580–581.
- Krull, C., Böhme, B., Clausen, PH., Nijhof AM. Optimization of an artificial tick feeding assay for *Dermacentor reticulatus*. *Parasit. Vectors* 2017, 10, 60.
- Kröber T., Guerin P.M. *In vitro* feeding assays for hard ticks. *Trends Parasitol.* 2007, 23 (9), 445–449.
- Levin M.L., Schumacher L.B.M. Manual for maintenance of multi-host ixodid ticks in the laboratory. *Exp. Appl. Acarol.* 2016, 70, 343–367.
- Makram N. Kaiser M.N. The Subgenus *Persicargas* (Ixodoidea, Argasidae, *Argas*). 3. The Life Cycle of *A. (P.) arboreus*, and a Standardized Rearing Method for Argasid Ticks. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 1966, 59 (3), 496–502.
- Mango C.K.A., Galun R. Suitability of Laboratory Hosts for Rearing of *Ornithodoros Moubata* Ticks (Acari: Argasidae). *J. Med. Entomol.* 1977, 14(3), 305–308.
- Manilla G., Carluci G. Sull'invasione di *Argas (A.) reflexus* (Acari, Ixodoidea, Argasidae) in un'abitazione centrale di L'Aquila (Fotochimico-recettori e ruolo patogeno). *Riv. Parassitol.* 1985; 46, 197–120.
- Miadonna A., Tedeschi A., Leggiero E., Falagiani P., Nazzari M., Manzoni M., Zanussi C. Anaphylactic shock caused by allergy to the venom of *Argas reflexus*. *Ann. Allergy.* 1982, 49(5), 293–294.
- Micks D.W. The laboratory rearing of the common fowl tick, *Argas persicus* (Oken). *J. Parasitol.* 1951, 37(1), 102–105.
- Montes C., Cuadrillero C., Vilella D. Maintenance of a laboratory colony of *Cimex lectularius* (Hemiptera: Cimicidae) using an artificial feeding technique. *J. Med. Entomol.* 2002, 39(4), 675–679.
- Nuss A.B., Mathew M.G., Gulia-Nuss M. Rearing *Ixodes scapularis*, the Black-legged Tick: Feeding Immature Stages on Mice. *J. Vis. Exp.* 2017, (123), e55286.
- Patrick C.D., Hair J.A. Laboratory Rearing Procedures and Equipment for Multi Host Ticks (Acarina: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 1975, 12 (3), 389–390.
- Quercia O., Emiliani F., Foschi F.G., Stefanini G.F. Anaphylactic shock to *Argas reflexus* bite. *Allergy and Immunology (Paris)*. 2005, 37, 66–68.
- Slovák M., Labuda M., Marley S.E. Mass laboratory rearing of *Dermacentor reticulatus* ticks (Acarina, Ixodidae). *Biologia, Bratislava* 2002, 57, 261–266.
- Śpiewak R., Lundberg M., Johansson G.O., Buczek A. Allergy to pigeon tick (*Argas reflexus*) in Upper Silesia, Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2006, 13(1), 107–112.
- Veraldi S., Barbareschi M., Zerboni R., Scarabelli G. Skin manifestation caused by pigeon ticks (*Argas reflexus*). *Cutis.* 1998, 61(1), 38–40.

Voigt W.P., Young A.S., Mwaura S.N., Nyaga S.G., Njihia G.M., Mwakima F.N., Morzaria S.P. *In vitro* feeding of instars of the ixodid tick *Amblyomma variegatum* on skin membranes and its application to the transmission of *Theileria mutans* and *Cowdria ruminantum*. *Parasitology* 1993, 107(3), 257–263.

Weckesser S., Hilger C., Lentz D., Jakob T. Anaphylactic reactions to bites of the pigeon tick *Argas reflexus*. *Eur. J. Dermatol.* 2010, 20(2), 244–245.

Waladde S.M., Ochieng' S.A., Gichuhi P.M. Artificial-membrane feeding of the ixodid tick, *Rhipicephalus appendiculatus*, to repletion. *Exp. Appl. Acarol.* 1991, 11, 297–306.

Wegner Z. Laboratory study on some parasitic hematophagous Arthropods as possible subsidiary links of the biocenosis of tick-borne encephalitis. *Bull. Inst. Mar. Trop. Med. Gdańsk.* 1973, 27, 75–85.

Winston P.W., Bates D.H. Saturated solutions for the control of humidity in biological research. *Ecology* 1960, 41, 232–237.