

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 244646 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **439910**

(22) Data zgłoszenia: **2021.12.20**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.06.26 BUP 26/2023**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.02.19 WUP 08/2024**

(51) MKP:

B01L 3/14 (2006.01)

A01M 1/02 (2006.01)

A01M 5/02 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:
**UNIWERSYTET WARMIŃSKO-MAZURSKI
W OLSZTYNIE, Olsztyn, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:
REMIGIUSZ GAŁĘCKI, Olsztyn, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Izabella Raniszewska, Olsztyn, PL

(54) Tytuł:

Pojemniki do przetrzymywania i transportu ektopasożytów, zwłaszcza muchówek z rodziny Hippoboscidae ze środowiska naturalnego

PL 244646 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są pojemniki do przetrzymywania i transportu ektopasożytów, zwłaszcza muchówek z rodziny Hippoboscidae ze środowiska naturalnego do celów badawczych w dziedzinie medycyny weterynaryjnej, entomologii, parazytologii, badaniach środowiskowych, diagnostyce laboratoryjnej i zoologii.

Muchówki z rodziny Hippoboscidae (Narzępikowate) są obligatoryjnymi hematofagicznymi ektopasożytami ptaków i ssaków. Rodzina ta obejmuje 21 rodzajów, z których 4 (w tym *Hippobosca* spp. i *Lipoptena* spp.) pasożytują na ssakach, a 17 bytuje na ptakach lub w ich gniazdach. Rodzaj *Lipoptena* spp. (strzyżaki) składa się z 32 gatunków. Gatunki budzące największe obawy w medycynie weterynaryjnej to *L. cervi*, *L. capreoli* i *L. fortisetosa*, które są powszechnie spotykane w Europie, Syberii, Chinach i Ameryce Północnej, a także *L. depressa*, *L. mazamae* i *Neolipoptena ferrisi*, które można znaleźć w Ameryce Północnej i Południowej. Muchówki z rodzajów *Lipoptena* spp. i *Neolipoptena* spp. zrzucają skrzydła po znalezieniu żywiciela ostatecznego. Dorosłe narzępikowate muszą znaleźć żywiciela wkrótce po przeobrażeniu, aby pobrać krew. Jest im ona potrzebna do przeżycia i rozrodu. Muchówki poszukujące żywicieli są w stanie przelecieć ok 50 m, a ich loty są zwykle obserwowane między majem a listopadem.

Obserwowane obecnie zmiany klimatyczne doprowadziły do zmian w dynamice rozwoju populacji zwierząt, a także pojawienia się nowych gatunków w miejscach, gdzie dotąd nie występowały. Aberracje klimatyczne oraz migracje zwierząt zwiększyły populację opisywanych ektopasożytów w Europie. Z biegiem lat obserwowane jest powiększenie populacji muchówek z rodziny Hippoboscidae. Co więcej na terenie Centralnej Europy zaczęto obserwować gatunek inwazyjny – *L. fortisetosa*. Badania wskazują także na nowe wzorce migracji tych owadów, na przykład na tereny Europy Północnej.

Narzępikowate są potencjalnymi wektorami chorób zakaźnych. Wektory są częścią koncepcji „One Health”, ponieważ są odpowiedzialne za przenoszenie patogenów między ludźmi i zwierzętami dzikimi, gospodarskimi, towarzyszącymi i ludźmi. Pomimo licznych badań skupiających się na tych owadach, dotychczasowa wiedza na ich temat jest powierzchowna, a ich znaczenie weterynaryjne jest enigmatyczne. Jednym z powodów takiego stanu rzeczy jest luka metodyczna, która uniemożliwia badanie narzępikowatych w zamkniętych układach laboratoryjnych jak i potrzeba ciągłego pozyskiwania owadów ze środowiska.

Warunki środowiskowe odgrywają dużą rolę w liczebności i przeżywalności narzępikowatych. Należy zauważyć, że warunki pogodowe mogą również znacząco wpływać na zachowanie i fizjologię tych owadów. Badania wskazują, że te ektopasożyty wykształciły silne mechanizmy adaptacyjne do niskich temperatur. Wykazano, że *L. cervi* może przetrwać w niekorzystnych warunkach nawet bez okresu aklimatyzacji. Pomimo wysokiej odporności na warunki środowiskowe, wiele gatunków wchodzących w skład tej rodziny nie przetrwa bez pożywienia. Skutkuje to utrudnionym transportem żywych owadów do laboratorium w celu zbadania ich behawioru czy założenia hodowli laboratoryjnej. Średni czas przeżywalności tych owadów bez dodatkowych zabiegów protekcyjnych wynosi 2–6 h w zależności od temperatury. Z uwagi, że muchówki te, żyją czasem w ciężko dostępnych biotopach, śmiertelność wśród pozyskanych owadów jest duża. Problemатyczne staje się też przewiezienie owadów do laboratorium z terenów odległych.

Celem wynalazku było opracowanie pojemników, które pozwalają na nieinwazyjne przenoszenie żywych owadów do laboratorium czy hodowli. Na podstawie przeprowadzonych obserwacji wynika, że można przedłużyć żywotność muchówek z rodziny narzępikowatych nawet do 96 h. Obserwację przeprowadzono na przykładzie gatunków *L. cervi* i *L. fortisetosa*.

Według wynalazku pojemniki do przetrzymywania i transportu ektopasożytów, zwłaszcza muchówek z rodziny Hippoboscidae ze środowiska naturalnego charakteryzuje się tym, że zakrętka pojemnika posiada co najmniej jeden otwór powietrzny o wielkości od 0,5 mm, a w środku pojemnik posiada materiał sorpcyjny nasączony antykoagulantem, na który naniesiona jest krew ssaka lub ptaka. Stężenie antykoagulantu we krwi wynosi od 0,001 mg/ml do 1000 mg/ml.

Korzystnie gdy antykoagulantem jest 0,1% – 99% roztwór K2 lub K3 EDTA.

Korzystnie gdy antykoagulantem jest heparyna, fluorek sodu, szczawian potasu, octan jodu.

Jest to rozwiązanie pozwalające na wydłużenie czasu życia muchówek utrzymywanych w warunkach sztucznych. Opisywana technika jest szczególnie skuteczna wobec gatunków z rodziny *Hippobosca* spp. i *Lipoptena* spp. Pojemnik daje możliwość sztucznego karmienia ektopasożytów, a przez to zwiększa przeżywalność pozyskanych osobników.

Pojemniki transportowe mogą być wykorzystywane także do utrzymywania owadów np. w laboratorium.

Ponadto pojemniki zgodne z wynalazkiem:

- umożliwiają transport żywych owadów.
- są proste do wykonania
- wydłużają czas przeżycia owadów bez żywiciela specyficznego
- zmniejszają śmiertelność wyłapanych owadów ze środowiska
- pozwalają na dostarczenie największego odsetka żywych narzępikowatych do laboratorium.

Przedmiot wynalazku zostanie przedstawiony w przykładach wykonania na rysunku, na którym fig. 1 przedstawia pojemnik w postaci probówki, fig. 2 – pojemnik w kształcie prostopadłościanu z siatką w zakrętce, fig. 3 – pojemnik w kształcie prostopadłościanu z łopatką.

Przykład 1

W laboratorium prowadzone są badania na temat przeżywalności *Lipoptena* spp. po ekspozycji na iwermektynę. Najbliższe znane stanowisko występowania strzyżaków znajduje się 100 km od jednostki. Na miejsce udały się 3 osoby ubrane w ciemnobrązowe ubrania z bawełny i zamazu. Zbieracze podążali po tropach stada jeleni. Czas marszu wynosił około 30 min, z 10 minutowymi przerwami na wyłapanie owadów ze swoich ubrań. Pozyskane owady zostały umieszczone w pojemnikach transportowych przygotowanych na początku procedury. Pojemniki transportowe zostały przedstawione na fig. 1.

Opis pojemnika transportowego:

Do stworzenia pojemnika wykorzystano sterylne probówki 1 wymazowe. W zatyczce 2 probówki 1 wykonano cztery otwory 3 powietrzne co 90° o średnicy 1 mm. Wymazówka składała się z plastikowej pałeczki 4 zakończonej wyjąłowaną bawełną 5. Bawełna 5 została nasączona krwią z antykoagulantem 6. Krew została pozyskana od bydła i została pobrana do probówki morfologicznej z K3 EDTA. Stężenie EDTA we krwi wynosiło 1,8 mg/ml. Bawełna została nasączona przy użyciu 0,25 ml krwi z antykoagulantem.

Zbieracze w przygotowanych pojemnikach transportowych umieścili po 5 owadów. Łącznie pozyskano 60 owadów 7 umieszczonych w 12 probówkach transportowych. Probówki zostały umieszczone w pojemniku utrzymującym temperaturę w zakresie od 20°C do 25°C. Natężenie światła w pojemniku wynosiło 2nx. Owady transportowane były przez 2h do jednostki badawczej. Po 10h od pobrania wymieniona została bawełna z krwią. Owady były utrzymywane przez 26 h w pojemnikach transportowych, aż do rozpoczęcia eksperymentu.

Przykład 2

W jednostce badawczej tworzony jest nowy repelent przeciwko *Hippobosca equina*. Do przeprowadzenia tych badań należy wykorzystać żywe owady. Muchówka może być pozyskana na przykład w trakcie pobierania krwi od bydła. Naukowcom znane jest 7 potencjalnych miejsc w których można pobrać tego owada. Łączny czas potrzebny na monitoring, złapanie i transport wynosi około 10 h. Pozyskane owady zostały umieszczone w pojemnikach transportowych przygotowanych na początku procedury. Wykorzystane pojemniki transportowe zostały przedstawione na fig. 2.

Opis pojemnika transportowego:

Pojemnik 1 ma kształt prostopadłościanu o pojemności 100 ml. W zakrętce 2 wycięto otwór 3 i przymocowano szczelnie siatkę (wielkość oczek 1 mm) przy użyciu pistoletu klejowego. Do dna pojemnika przymocowany jest płatek wiskozowy 5. Płatek wiskozowy 5 został nasączony krwią z antykoagulantem 6. Krew została pozyskana od bydła, pobrana do probówki morfologicznej z K2 EDTA. Stężenie EDTA we krwi wynosiło 2 mg/ml. Wiskoza została nasączona przy użyciu 1 ml krwi z antykoagulantem bezpośrednio przed pozyskaniem owadów.

Zbieracze w przygotowanych pojemnikach transportowych umieścili od trzech do sześciu owadów 7, które zostały pozyskane z różnych lokalizacji. Owady 7 z różnych lokalizacji transportowano w innych pojemnikach. Transport odbywał się w temperaturze 15°C ± 3°C. Natężenie światła w pojemniku wynosiło 100001x. Owady 7 transportowane były przez 2 h do jednostki badawczej. Po 24 h od pobrania owady zostały przeniesione do nowych pojemników wraz ze świeżą krwią i były utrzymywane aż do użycia.

Przykład 3

W celu wykazania różnic w behawiorze płciowym muchówek z rodzaju *Lipoptena* spp. przynależących do różnych populacji geograficznych należy pozyskać owady z różnych, czasem odległych

miejsc. W tym celu wybrano populacje oddalone od siebie o 1000 km. Czas pozyskania owadów i ich przetransportowania do laboratorium szacowany jest na około 20 h. Na miejsce wybrała się jedna osoba. Zbieracz ubrany był w wykonany z wełny czarny strój zakrywający całe ciało. Droga jaką poruszał się zbieracz wiodła przez siedliska jeleniowatych. Czas marszu wynosił od 15 min, z 5 minutowymi przerwami na wyłapanie owadów ze swoich ubrań. Pozyskane owady zostały umieszczone w pojemnikach transportowych przygotowanych na początku procedury. Pojemniki transportowe zostały przedstawione na fig. 3.

Pojemnik 1 w kształcie prostopadłościanu o pojemności 20 ml. W zakrętce 2 wykonano dwa otwory 3 powietrzne co 180°. Zakrętka 2 posiadała łopatkę 4, na której przymocowana została bawełna 5 jako materiał sorpcyjny. Został on nasączony krwią z antykoagulantem 6. Krew została pozyskana od człowieka i została pobrana do próbki morfologicznej z K3 EDTA. Stężenie EDTA we krwi wynosiło 1,5 mg/ml. Bawełna 5 została nasączona przy użyciu 0,2 ml krwi z antykoagulantem 6.

Zbieracz w przygotowanych pojemnikach transportowych umieścił po 7 ektopasożytów. Łącznie pozyskano 35 strzyżaków umieszczonych w 5 pojemnikach transportowych. Zostały one umieszczone w pojemniku utrzymującym temperaturę w zakresie od 16°C do 22°C. Natężenie światła w pojemniku wynosiło 1001x. Ektopasożyty po 20 h podróży docierają do laboratorium. Pozyskane osobniki następnie zostają przeniesione do nowych identycznych pojemników. Przy stałej temperaturze 20°C i natężeniu światła na poziomie 501x były utrzymywane 24 h aż do użycia

Zastrzeżenia patentowe

1. Pojemniki do przetrzymywania i transportu ektopasożytów, zwłaszcza muchówek z rodziny Hippoboscidae ze środowiska naturalnego **znamienny tym**, że zakrętka (2) pojemnika (1) posiada co najmniej jeden otwór (3) powietrzny o wielkości od 0,5 mm, a w środku pojemnik (1) posiada materiał sorpcyjny (5) nasączony antykoagulantem (6), na który naniesiona jest krew ssaka lub ptaka, przy czym stężenie antykoagulantu we krwi wynosi od 0,001 mg/ml do 1000 mg/ml.
2. Pojemnik wg zastrz. 1 **znamienny tym**, że antykoagulantem (6) jest 0,1% – 99% roztwór K2 lub K3 EDTA.
3. Pojemnik wg zastrz. 1 **znamienny tym**, że antykoagulantem (6) jest heparyna, fluorek sodu, szczawian potasu, octan jodu.

Rysunki

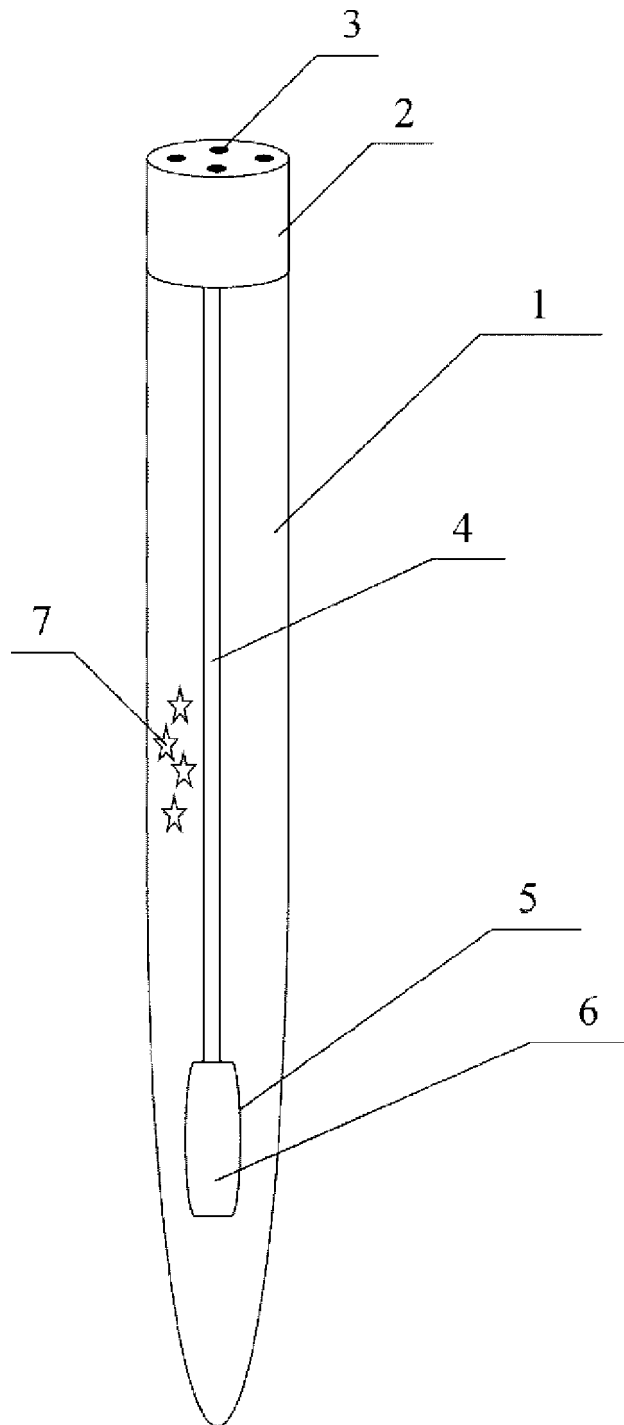


Fig.1

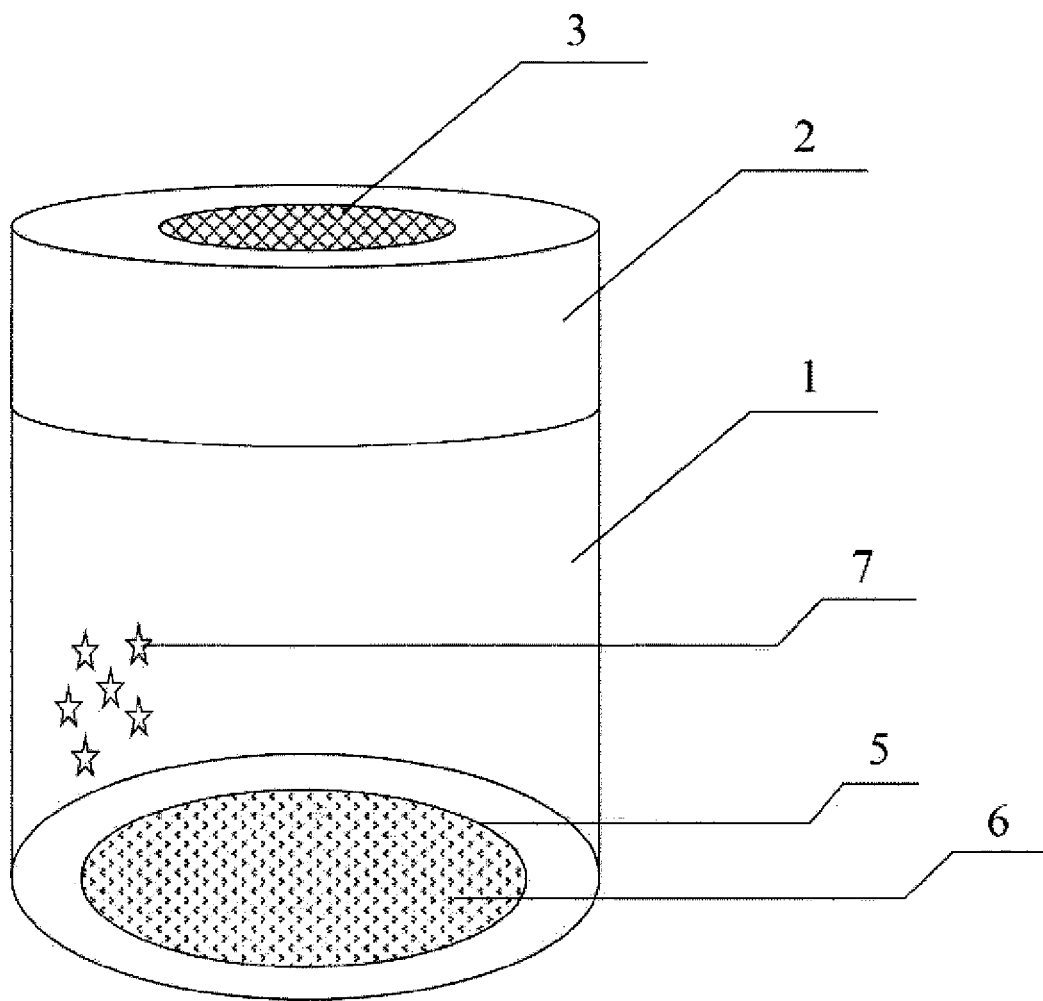


Fig.2

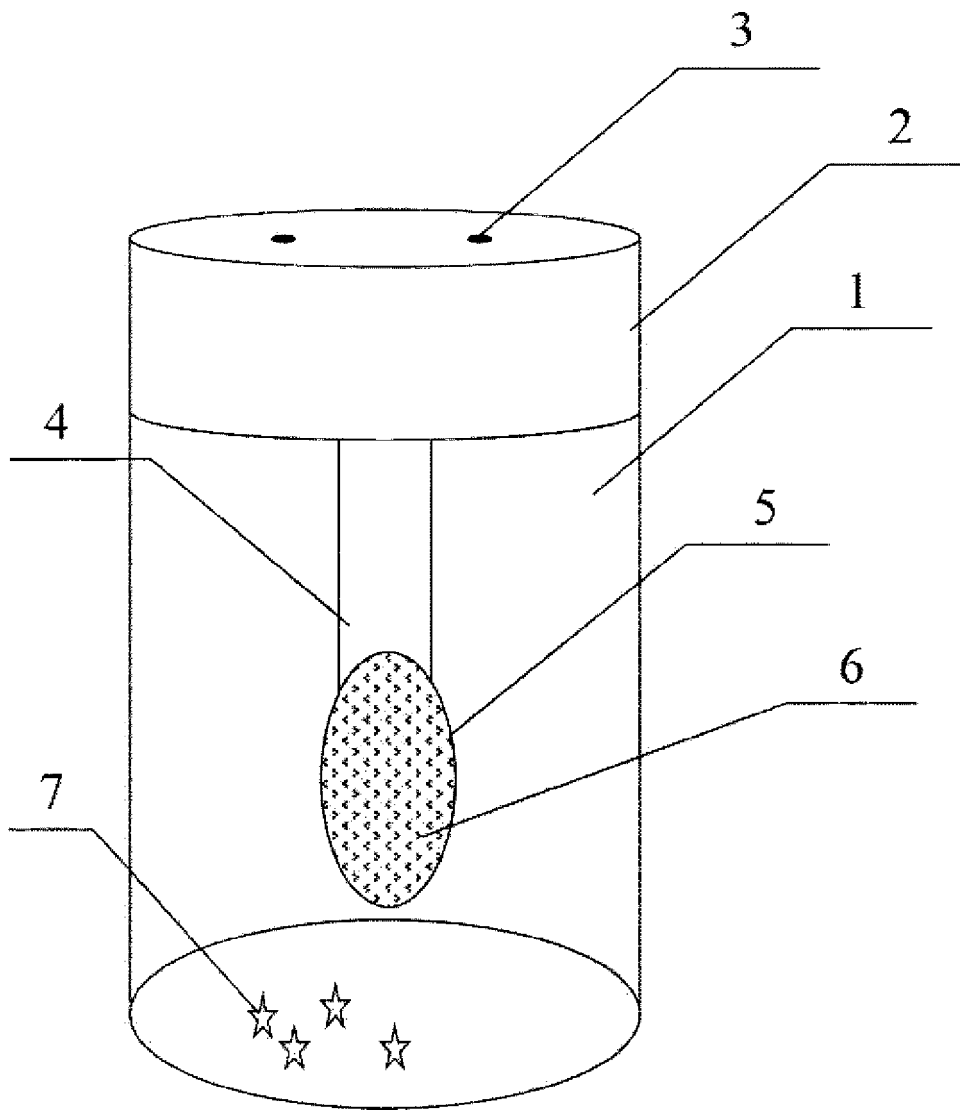


Fig. 3