

Univerzita Karlova Praha  
farmaceutická fakulta v Hradci Králové

**Léčiva využívaná v současnosti ke kontrole varroázy včel a  
experimentální ověření kombinace vybraných léčiv**

Rigorózní práce, 2009

Jan Černý

## **Úvod a cíle práce**

Varroáza je ektoparazitóza včel a v posledních 20-ti letech se stala závažným zemědělsko - ekologicko - ekonomickým problémem. Vlivem přemnožení původce nákazy roztoče *Varroa destructor* v zimě 2007/08 byly zaznamenány masivní úhyny v chovech včel, které se v České republice místy blížily až 90 % zazimovaných včelstev. Dochází tedy k ohrožení opylování nejen hospodářských plodin a s tím souvisejícími negativními ekonomickými dopady v zemědělství, ale i entomofilních druhů ve volné přírodě, což z dlouhodobého hlediska může vést k nezvratnému porušení rovnováhy ekosystémů.

Cílem této práce je shrnout všechny možnosti kontroly varroázy včel s přednostním zaměřením na léčiva a na základě dostupných publikovaných prací zpracovat jejich přehled včetně souvisejících charakteristik. V experimentální části bylo cílem vyhodnotit potenciální přínos kombinace kyseliny mravenčí a thymolu jako dvou vybraných léčiv s účinností proti původci varroázy včel.

### **Poděkování:**

Vyjadřuji velký dík Prof. RNDr. Jiřímu Lamkovi CSc. za odborné vedení a Ing. Daliboru Titěrovi CSc. z Výzkumného ústavu včelařského za cenné rady při psaní této práce a svým včelám a manželce za trpělivost.

Autor

### **Prohlášení:**

Prohlašuji, že tato práce je původní a využívá pouze citované literární zdroje.

Autor

## Obsah

### Úvod a cíle práce

1.1. Teoretická část.....	5
1.2. Režimová opatření kontroly nákazy.....	7
1.3. Léčiva využívaná ke kontrole varroázy.....	9
1.3.1. Pyretroidy.....	9
1.3.1.1. Fluvalinat.....	9
1.3.1.2. Akrinatriin.....	11
1.3.1.3. Flumetrin.....	12
1.3.2. Organické kyseliny.....	13
1.3.2.1. Kyselina mravenčí.....	13
1.3.2.2. Kyselina šťavelová.....	15
1.3.2.3. Kyselina mléčná.....	16
1.3.3. Amitraz .....	18
1.3.4. Cymiazol.....	19
1.3.5. Organofosfáty.....	20
1.3.5.1. Kumafos.....	20
1.3.5.2. Cekafix.....	21
1.3.6. Bromopropylat .....	22
1.3.7. Monoterpeny.....	23
1.3.7.1. Thymol.....	23
1.3.7.2. Kombinace monoterpenů.....	24
1.3.8. Biologická léčba.....	24
1.3.9. Ostatní léčebné postupy.....	25
2. Experimentální část.....	27
2.1. Materiál a metodika.....	27
2.1.1. Způsob přípravy odparných desek.....	27
2.1.2. Plán experimentu.....	28
2.2. Výsledky.....	29
2.3. Diskuse.....	31
2.4. Závěr.....	33

3. Literatura.....34

## 1.1. Teoretická část

Varroáza (český a nepříliš často uváděný název parazita je kleštík včelí) je zevní parazitální onemocnění včely medonosné (*Apis mellifera*) a indické (*Apis cerana*) způsobené roztočem původně nazvaným *Varroa jacobsoni* Oudemans. Prvním hostitelem roztoče byla včela indická, ze které byl přenesen na včelu medonosnou na Filipínách a Hong Kongu zřejmě v roce 1962-1963 (Delfinado, 1963); zde došlo k prvnímu kontaktu druhu *Apis mellifera* s roztočem tehdy taxonomicky pojmenovaným *Varroa jacobsoni*, který byl poprvé popsán Oudemansem již v roce 1904 na indonéském ostrově Jáva (Sanford, 2007). Odtud došlo k téměř kosmopolitnímu rozšíření - zatím s výjimkou Austrálie a Oceánie, kam ještě nebyl zavlečen. V České republice byl poprvé popsán Samšiňákem a Haragsimem (1972).

V roce 2000 popsali Anderson a Trueman při studiu mtDNA Co-I genu rozdílné morfologické charakteristiky roztočů pocházejících z východní Asie a ostatních částí světa a dospěli k názoru, že se jedná o dva různé druhy roztočů. *Varroa jacobsoni* Oudemans napadá včelu indickou v oblasti Malajsie a Indonésie. Je pro tuto včelu relativně neškodný, včely si jej vzájemně vykusují. *Varroa destructor* Anderson a Trueman (*V. destructor*) je parazitem jak včely indické ve většině Asie tak včely medonosné po celém světě. Tento druh roztoče způsobuje varroázu včel. Roztoče *Varroa* lze nalézt i na druhu čmeláka *Bombus pennsylvanicus* a na mušce *Palpada vinetorum* (Kevan, 1990). Na těchto druzích se však nerozmnožuje, mohou však být vektory přenosu nákazy.

Dospělá, pouhým okem viditelná samička roztoče, je hnědá až tmavě hnědá, tělo má tvar kraba, dlouhá 1,0-1,8 mm a 1,5-2,0 mm široká, má 8 nohou. Dospělý sameček je pouhým okem neviditelný. Jeho délka je 0,75-0,98 mm šířka 0,7-0,88 mm, barvy nažloutlé. Optimální teplota pro jeho rozvoj je 32,9 °C (teplota zavíčkovaného dělničího plodu je 34 - 36 °C, trubčího 30 - 34 °C. Rozmnožovací cyklus je desetidenní. Samička *V. destructor* vnikne před zavíčkováním do dělničího nebo trubčího plodu. V závislosti na teplotě naklade samička roztoče 1-7 vajíček (Young, 2007). Výskyt v trubčím plodu je 5-9x pravděpodobnější, než v plodu dělničím (Calderone and Kuenen, 2001), zřejmě z důvodu delšího vývoje zavíčkovaného trubčího plodu (14 dní) To je pro roztoče

výhodnější, oproti tomu vývoj roztoče v matečnicích je výjimečný, mateřská buňka je zavíčkovaná jen zhruba 8 dní. Existuje však i další vysvětlení, které se opírá o rozdílné složení krmné šťávy jednotlivých typů larev a Drijfhout (2005) se domnívá, že některé komponenty mateří kašičky působí na samičky roztoče odpudivě a z tohoto důvodu se v mateřském plodu téměř nevyskytuje. V zavíčkované buňce proběhne vývoj parazita a dospělci se spáří. Společně s dělnicí či trubcem opouští buňku dvě až šest oplozených samic roztoče. Roztoč preferuje napadení trubčího plodu, zřejmě také z důvodu produkce atraktantů - methyl a ethyl esterů mastných kyselin, mezi něž patří i methylpalmitát (Le Conte, 1989).

Parazit se živí hemolymfou včel nabodáváním jejich kutikuly a pasivně se účastní přenosu virových nákaz, např. viru deformovaných křídel, viru akutní paralýzy včel a jiných. Ve studii Shena a kol. (2005) byla popsána pozitivní korelace mezi počtem roztočů napadajících včelí larvy a titrem virové RNA u viru deformovaných křídel a kašmírského včelího viru. Bowen - Walker (1999) připouští, že některé viry mají zřejmě schopnost množit se i ve *V. destructor*. Přemnožený roztoč způsobuje u vylíhlých včel deformace křídel, nohou, zadečku a hrudi, včela není schopna života a hyne. Varroáza zřejmě přispívá ke Colony Collapse Disorder (CCD). Toto doposud záhadné onemocnění se projevuje tak, že včelař nalézá úl zpravidla se včelí matkou, zásobami a plodem, ale bez včel. CCD je velkým problémem zvláště USA a o jeho příčinách se spekuluje. Varroáza se šíří sociálním kontaktem, především zalétáváním dělnic a trubců, roji a přesunem včelstev. Za den si včelstvo může přinést až několik set roztočů.

Monitoring nákazy (in Young, 2007) lze provádět těmito způsoby:

a/ vzorkováním dospělých včel: Odchytí se 300-500 dělnic do kádinky, přidá se 70% ethanol a nechá usadit několik minut, poté se pinzetou odstraňují jednotlivé včely, které se prohlíží, zda na nich neulpěl roztoč. Intenzita nákazy se určí ze vztahu počet roztočů x 100 / počet včel = % postižených včel. Stupně intenzity jsou do 5 % (nákaza mírná), 5-10 % (nákaza vyžadující brzký léčebný zásah), 10-20 % nákaza vyžadující okamžitou léčbu a při postižení nad 20% hrozí včelstvu kolaps.

b/ vzorkováním zavíčkovaného plodu: Podle šablony 5 x 4 cm se nožem vyřízne asi 300 buněk zavíčkovaného plodu. Pinzetou se vyndávají jednotlivé kukly a proplachují v 70%

ethanolu, jemným kartáčkem se zkontrolují buňky po odstraněných kuklách, pro případ, že by v nich uvízl roztoč. Zaznamenává se počet včel (kukel), které měly roztoče, nikoliv počet roztočů. Stupeň nákazy se vypočte ze vztahu: počet kukel s roztočem x 100 / počet kukel. Kritéria pro posouzení stupně nákazy jsou stejné jako u vzorkování dospělých včel.

c/ přirozený spad roztočů: Na dno úlu se umístí síťová podložka, na níž je namazán margarín. Po určité době se margarín s tím, co na něj napadalo (roztoči, vosk, propolis), seškrábne do kádinky a přelije horkou vodou - propolis, vosk a margarín roztají, po promíchání se směs přefiltruje přes jemné sítko, ve kterém se zachytí roztoči.

U nás se provádí monitoring spadu samiček roztoče v měli z podložek ze zimního spadu, popřípadě z v podletí vložených síťových podložek. Tyto podložky začínají být doporučovány pro rutinní použití pro možnost posouzení intenzity infestace a pro přijetí vhodných protiopatření. Průkaz se provádí prohlídkou podložky nebo rozmícháním měli v oleji či ethanolu. Roztoči vyplavou - flotují - na povrch (Texl, 2008).

## 1.2. Režimová opatření tlumení nákazy

Tato opatření nejsou kauzální léčbou varroázy, mohou však vhodným způsobem snížit infestaci včelstva a udržet nákazu na relativně přijatelné úrovni.

a/ Práškový cukr je rozprašován mezi rámky v dávce 15 gramů na včelstvo ve dvou nástavcích, ošetření je opakováno 4-6x. Byly aplikovány i jiné práškové substance, např. glukóza, pšeničná mouka, kamenný prach, talek (Fakhimzadeh, 2000).

b/ Stavební rámky s trubčím plodem se po zavíčkování vyjmou z úlu a nechají zmrazit v mrazáku. Zahynou jak roztoči, tak i trubci, což včelstvu ovšem nezpůsobí zásadní újmu. Rámek se z mrazáku opět vloží do včelstva, včely plod odstraní a část bílkovin zužitkují dále. Po zaklazení tohoto rámků se postup opakuje.

c/ Rámek s trubčím plodem se vyřezává. Včely jej opět vystaví, matka zaklade a postup se opakuje. Přínos tohoto postupu popsal Calderone (2005). Včelstva ve studii rozdělil

do dvou skupin, v jedné opakovaně vyřezával trubčí plod, druhá byla kontrolní. Nejen že došlo ke snížení infestace včelstev, dokonce ve skupině, kde se odšťavňoval trubčí plod, došlo ke zvýšení výnosu medu.

d/ Při použití léčiv, která nepronikají do zavíčkovaného plodu (prakticky všechna s výjimkou kyseliny mravenčí), je vhodné zaklíčkovat matku tak, aby v době ošetření včelstva nebyl přítomen zavíčkovaný plod.

e/ Někteří chovatelé provádějí více či méně zdařilé pokusy selektovat ty linie včel, které jsou schopny se roztoče spontánně zbavovat - vykusovat si ho (Correa - Marques, 2002). Ve studii Montero (2006) uvádí, že afrikanizované včely (*Apis mellifera scutellata*) jsou schopny rozeznat nenapadenou larvu od napadené a tu odstranit, popřípadě postiženou larvu nezavíčkovat a tím zabránit rozmnožování *V. destructor*.

f/ Webster et al. (2000) se zabývá osudem roztočů, kteří spadnou ze včel a jsou životaschopní (přirozený spad) i těch, kteří spadnou při/po léčbě. Ti potom mohou opět vyšplhat do včelstva, popřípadě, pokud spadli v blízkosti česna, nakazit včelu při vletu/výletu z úlu a navíc získat rezistenci na podané léčivo. Řešení spatřuje v pasti či síťovém dně - varroa dno, které se prosazuje v rámci preventivních opatření při kontrole nákazy.

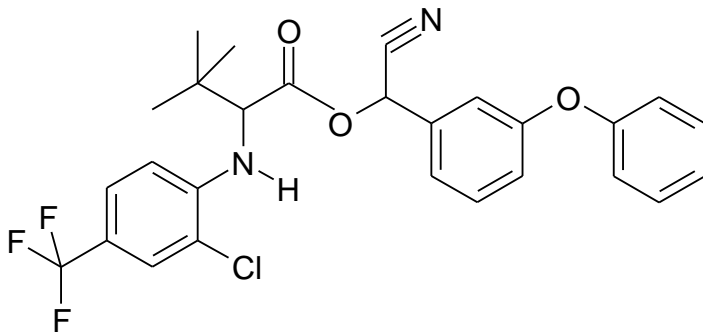


### 1.3. Léčiva využívaná ke kontrole varroázy

#### 1.3.1. Pyretroidy

Tato skupina léčiv patří mezi nepoužívanější varroacidy. Mechanismus účinku spočívá ve alteraci transportu sodíku do buněk neuronů. Rezistentní populace roztoče vzniká záměnou aminokyseliny L1770 ( leucin za prolin) spojující doménu III a IV transportního proteinu sodíkového kanálu. Tato varianta proteinu je běžná u hmyzu, nikoli roztočů (Liu et al., 2006). V Izraeli provedená studie ukázala zvýšení aktivity monooxygenázy a esterázové aktivity fluvalinat-rezistentních roztočů oproti kontrole (Miozes – Koch, 2000).

##### 1.3.1.1. Fluvalinat



**Obr. 1: fluvalinat**

Fluvalinat patří mezi syntetické pyretroidy. V České republice jsou schválené preparáty s touto účinnou látkou MP 10 FUM, Gabon PF 90 (1 proužek obsahuje 90 mg fluvalinatu) a M1 AER pro aplikaci aerosolem. U fluvalinatu se úmrtnost roztočů pohybuje v různých studiích mezi 95-98 % (Henderson, 1988; Borneck, 1990; Faucon, 1995). I v případě rezistence k preparátům obsahujícím fluvalinat byla prokázána účinnost mezi 30-50 % v závislosti na koncentraci fluvalinatu v léčivu.

Metody aplikace:

a/ fumigace u MP 10 FUM se aplikují dvě kapky na obsednutý nástavek

b/ aerosol vodní emulze při teplotě nad 10°C nebo acetonový roztok při teplotách nižších se vhání ve formě aerosolu do česna úlu, kde ničí roztoče na dopělých včelách.

c/ proužek u nás registrovaný Gabon PF 90, v zahraničí např. Apistan či Mavrik, kde účinnou látku je impregnovaný plátek dřeva (Lubievski, 1988).

Nežádoucí účinky: Frilli et al. (1991) stanovili úhyn dospělých včel po aplikaci fluvalinatu po dobu 60 dnů na 2,7 včely/den. Aplikace 1% fluvalinatu po tři dny u zaklíčkových včel způsobila významné zvýšení úhynu dělnic a zvětšila se tendence k výměně matky. Sedmidenní expozice vedla ke zvýšení smrtnosti matek (Currie, 1999).

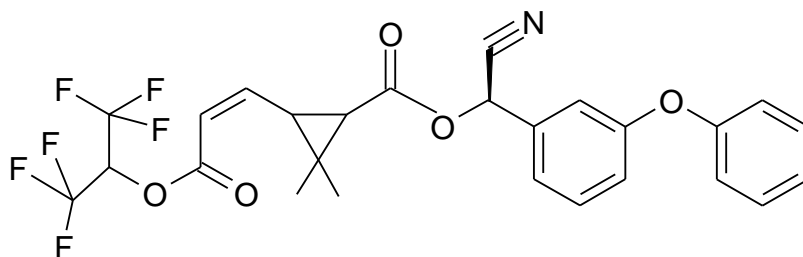
Rezidua: fluvalinat patří mezi stabilní, netěkavé, v tučích rozpustné látky. Kumuluje se ve včelím vosku, nerozkládá se. Rezidua fluvalinatu v plástech jsou schopna zabít *V. destructor* ještě rok po ošetření (Moosbeckhofer, 1991). Ke snížení schopnosti ukládat se do včelího vosku nedochází ani při použití ozónu nebo peroxidu vodíku k ošetření vosku (Veselý, 1994). Stejně tak zahřátí vosku přes 100°C za vysokého tlaku neovlivňuje kontaminaci vosku fluvalinatem (Wallner, 1995). Podobně jako ve vosku je schopen fluvalinat přecházet do medu a to v důsledku přítomnosti velmi drobných kousků vosku při vytáčení medu nebo přímo pronikáním fluvalinatu z ošetřených plástů do medu. Při koncentraci fluvalinatu přes 400 mg/kg vosku jsou prokazatelná rezidua v medu (Wallner, 1995). V jedné belgické studii měl pouze jeden z 215 vzorků medu rezidua fluvalinatu (0,004 mg/kg), přestože většina vzorků vosku obsahovala 1-10 mg/kg a v některých případech až 50 mg/kg fluvalinatu (De Greef, 1994). Fluvalinat je problematickým reziduem i v propolisu. V jedné švýcarské studii 28 z 29 vzorků propolisu obsahovala rezidua fluvalinatu a to průměrně 9,8 mg/kg (Bogdanov, 1998). Stejně tak alkoholový extrakt propolisu obsahuje rezidua fluvalinatu (Wallner, 1995). Při výchozí koncentraci fluvalinatu 0,2 mg/kg v medu trvá 28 týdnů než je koncentrace pod hladinou detekce (tj. 0,005 mg/kg) (Balayannis, 1992).

Maximální reziduální hodnoty: Oficiální maximální reziduální hodnoty pro fluvalinat v medu se pohybují mezi 0,01 mg/kg v Itálii a Německu k 0,05 mg/kg v Holandsku a Spojených státech. Evropská unie nemá stanovený jednotný reziduální obsah fluvalinatu v medu (Wallner, 1999). Spojené státy jsou jedinou zemí, která má stanovený limit pro fluvalinat ve včelím vosku – 6 mg/kg. Přesto je doporučováno, aby maximální hodnoty koncentrace fluvalinatu ve včelím vosku dosahovaly maximálně 1 mg/kg z důvodu prevence kontaminace medu (Wallner, 1995).

Rezistence: rezistence k fluvalinatu byla popsána nejprve v italské Lombardii v roce

1991 (Lodesani, 1995), rozšířila se dále po celé Itálii (kočovní včelaření) a odtud do Evropy (Milani, 1999; Faucon, 1995; Moosbeckhofer, 1996). Roztoč *V. destructor* rezistentní k fluvalinatu (v případě využívání přípravku Apistan) byla popsán i ve Spojených státech (Elzen, 1998).  $LC_{50}$  (koncentrace, která usmrtí 50 % roztočů) je u rezistentních populací 25-50x vyšší než u citlivých roztočů (Milani, 1995). Dále byla prokázána zkřížená rezistence s flumetrinem, podobně i ve Spojených státech potvrzená zkřížená rezistence s amitrazem (Elzen, 1999).

### 1.3.1.2. Akrinatrin



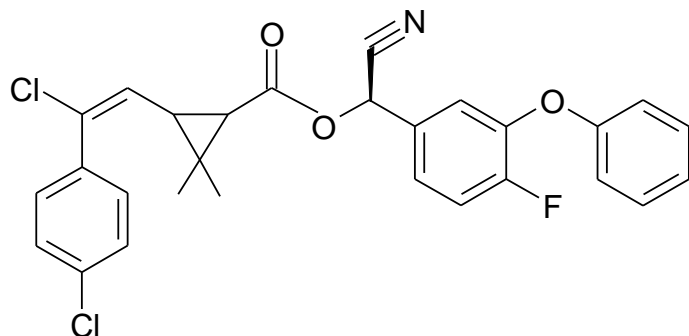
**Obr. 2: akrinatrin**

Tato látka byla připravena roku 1982 (The Merk Index, 1996). Akrinatrin je součástí u nás registrovaného preparátu Gabon PA 92 v koncentraci 1,5 mg na aplikační proužek, který se aplikuje na každých pět obsednutých rámků.

Rezidua: rezidua byla stanovena v koncentraci menší než 0,01 mg/kg medu a menší než 0,1 mg/kg vosku těsně po aplikaci Gabonu PA 92 (Túri, 1999). Jeho hlavním rozkladným produktem je 3-fenoxybenzaldehyd, který byl stanoven Bernalem (2000) pomocí GC/FID (plynové chromatografie s plamenově ionizačním detektorem).

Rezistence: zkřížený mechanismus stejně jako u ostatních pyretroidů (Lodesani, 2004).

### 1.3.1.3. Flumetrin



**Obr. 3: flumetrin**

Je také syntetickým pyretroidem. Mortalita roztoče obvykle přesahuje 95 %, často je i více než 99 % (Ruijter, 1991). Látka je součástí u nás neregistrovaného preparátu Bayvarol (3,6 mg na proužek). Aplikuje se na každých pět obsednutých rámků tak, aby k němu měly včely přístup z obou stran a mohly svým kontaktem mezi sebou tento akaricid šířit. Doba aplikace může být až 6 týdnů.

Rezidua: ačkoli se jedná o látku chemicky příbuznou fluvalinatu, rezidua nejsou větším problémem díky poměrně nízkému obsahu účinné látky v aplikační formě přípravku (3,6 mg flumetrinu na proužek oproti 880 mg fluvalinatu na proužek). Rezidua flumetrinu nebyla prokázána ve včelím vosku (Wallner, 1995; Bogdanov, 1998). Nízká hladina flumetrinu byla nalezena v plástech po opakované aplikaci (0,05 mg/kg), kdy zřejmě dochází ke kumulaci (Bogdanov, 1997). Studie však neprokázaly rezidua flumetrinu ve vzorcích medu (Haupt, 1996). Flumetrin byl však nalezen v propolisu, v jedné švýcarské studii 2 z 20 vzorků propolisu obsahovaly rezidua flumetrinu v průměrné koncentraci 2,4 mg/kg (Bogdanov, 1998).

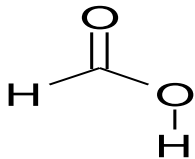
Maximální reziduální koncentrace: jsou pro flumetrin v medu od 0,005 ve Švýcarsku do 0,01 mg/kg v Německu, Evropská unie ani Spojené státy nemají stanovenou maximální reziduální koncentraci pro flumetrin (Wallner, 1999).

Rezistence: Populace *V. destructor* rezistentní k fluvalinatu jsou rezistentní i k flumetrinu - jedná se o chemicky velmi příbuzné látky. Rezistence k flumetrinu byla také popsána v laboratorních podmínkách (Milani, 1999).  $LC_{50}$  pro rezistentní roztoče je až 60x větší než pro roztoče citlivé (Milani, 1995).

### 1.3.2. Organické kyseliny

Terapie organickými kyselinami (označované jako soft chemical treatment) se v průběhu 90. let 20. století stala vhodnou alternativou při boji s varroázou a to hlavně v důsledku obav z kontaminace včelích produktů léčivy a vývojem rezistence k nim. Jednoduché organické kyseliny používané ke kontrole varroázy se ve větším či menším množství uplatňují jako složky medu, popř. jedu, kyselina mléčná vzniká při fermentaci pylu v plástech. Je otázkou jakou koncentraci dané kyseliny lze považovat za kontaminující a reziduální. Obecně můžeme tuto koncentraci vyjádřit jako takovou, která negativním způsobem zhoršuje organoleptické vlastnosti včelích produktů - jejich chuť a vůni. Z hlediska rezistence se tyto látky v důsledku jejich zapojení do metabolismu organismů a jejich enzymatických procesů považují za bezpečné a rozvoj rezistence se nepředpokládá (Fries, 1997).

#### 1.3.2.1. Kyselina mravenčí



**Obr. 4: kyselina mravenčí**

Kyselina mravenčí je nejjednodušší organickou kyselinou, která se používá k léčbě varroázy včel ve formě par, které tlumí dýchání roztoče (Imdorf, 1999). Různé systémy pro aplikaci by měly zajistit vysokou koncentraci par kyseliny po různě dlouhou dobu, která je doporučována výrobcí jednotlivých preparátů, resp. aplikačních systémů. Krátkodobé ošetření spočívá v umístění malého množství kyseliny (15 ml) na absorbční desku a to buď na horní loučku nebo v přímé aplikaci na dno úlu. Odpařování kyseliny mravenčí je nekontrolovatelné a musí být obvykle opakováno 5-6x po dobu 1-4 dnů. Dlouhodobé ošetření šetří čas a zahrnuje jednorázové umístění většího množství kyseliny v plastových, gelových nebo celulózových odpařovačích. Přípravek Apicure

obsahuje 30 g koncentrované kyseliny impregnované do gelového nosiče, Bee Var má stejnou formu gelového nosiče a vyžaduje dvě ošetření v 15ti denním intervalu. Oba preparáty se aplikují na horní loučky. Kramer (odparné desky) obsahují 150 ml kyseliny impregnované v jednom celulosovém nosiči. Aplikace spočívá v odstranění vnějšího obalu a umístění desky na horní loučky plástů s otvory směrem k včelstvu (Kramer, 1991). Vapidifus a Nassenheider jsou další zařízení pro odpařování kyseliny mravenčí s obsahem nádržky 130, resp. 180 ml. V České republice je registrován preparát s obsahem kyseliny mravenčí pod obchodním názvem Formidol a. u. v. připravovaný Výzkumným ústavem včelařským v Dole. Obsahuje 40 ml 85% technické kyseliny mravenčí. Aplikuje se stejně jako Kramer. Kyselina mravenčí je používána ke kontrole varroázy od 80. let (Koeniger, 1980; Ritter, 1980). Účinnost krátkodobé a dlouhodobé aplikace byla studována Imdorfem (1999). Účinnost 94 % byla dosažena při krátkodobé aplikaci ze dna úlu po 4 dny 4x (Wachendorfer, 1985). Odparné desky Kramer smrtí roztoče s účinností 95 % při použití na jaře a na podzim (Kramer, 1993). Odpařovač Nassenheider vykázal účinnost 94 %. Ve studii Charriete (1998) prokázal účinnost různých systémů odpařovačů mezi 92 a 98 %. Kyselina mravenčí v gelové matici prokázala 70% účinnost v porovnání s 61% účinností při čtyřech aplikacích tekuté kyseliny (Feldlaufer, 1997). Oproti tomu Schuster (1997) stanovil účinnost mezi 60 a 92 % v závislosti na metodě a teplotě okolního prostředí (Wilson, 1993). Calderone (1999) zdůrazňuje důležitost teploty při aplikaci. Při podzimním ošetření při nízké teplotě byla smrtnost roztočů pouze 56%. Zdá se, že optimální teplota ošetření je v pozdním létě po sklizni medu, kdy venkovní teploty dosahují 18-25°C (Imdorf, 1990). Účinnost ošetření může být stanovena vážením aplikátoru (odpařovače či odparné desky). Pokud je odpařeno denně 7 nebo více gramů, dá se předpokládat, že 95 % roztočů bude usmrceno během 14ti dnů. Při odpaření 10 a více gramů za den až 97 % roztočů (Imdorf, 1996). Předpokládá se, že kyselina mravenčí je schopna usmrtit roztoče *V. destructor* v zavíčkovaných buňkách stejně jako na dospělých včelách. Byly testovány plásty se zavíčkovaným plodem uzavřené v plastových krabicích s 50ml kyseliny mravenčí. Bylo usmrceno 100 % roztočů a 90 % včelího plodu ošetření přežilo (Fries, 1991). Při použití v terénu však těchto ideálních výsledků nebývá dosaženo. 17-ti hodinová aplikace 50% kyseliny mravenčí zabije roztoče v zavíčkovaném plodu bez

poškození matky a plodu (van Engelsdorp, 2008).

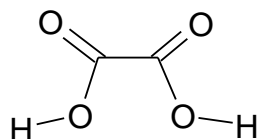
Nežádoucí účinky: Použití kyseliny mravenčí vedlo k odstraňování trubčích vajíček, snížení počtu trubců a zkrácení jejich přežití (24% přežití v 10ti dnech vs. 49% kontrola). Na rozdíl od fluvalinatu kyselina mravenčí nesnižuje váhu trubců či jejich vnitřních orgánů. Nutno dodat, že přeživší trubci měli více spermií, než trubci kontrolní (De Guzman, 1999). Kyselina mravenčí může poškozovat otevřený plod v závislosti na koncentraci a vnější teplotě (Liebik, 1997).

Rezidua: med obsahuje přirozeně malé množství kyseliny mravenčí, asi 5 – 600 mg/kg v závislosti na druhu medu. Kyselina mravenčí, která se používá pro tlumení varroázy, zvyšuje tento obsah v zimních zásobách a její obsah se snižuje k normálu po několika měsících (Stoya, 1986). Podzimní ošetření tedy může být doporučeno bez obav o kvalitu medu, jarní jenom s největší opatrností s rizikem reziduí v medu (Bogdanov, 1999).

Maximální reziduální hodnoty: Tyto hodnoty jsou stanoveny pro celkový obsah organických kyselin v medu, tj. do 40 miliekvivalentů kyseliny/kg, tj. takové množství organických kyselin, pro jejichž neutralizaci postačí maximálně 40 ml 0,1 mol roztoku jednosytného roztoku hydroxidu, např. sodného (Bogdanov, 1999).

Rezistence: doposud nebyla rezistence na kyselinu mravenčí popsána, předpokládá se, že k organickým kyselinám jako části přirozeného metabolismu všech organismů nemůže rezistence vzniknout (Fries, 1997).

### 1.3.2.2. Kyselina šťavelová



**Obr. 5: kyselina šťavelová**

Využívá se k ošetření včelstva ve formě postřiku (3%), v cukrovém sirupu pro bryndání, popř. ve formě par. Při aplikaci postřikem se aplikují 3-4 ml na jednu stranu plástu.

Optimálního účinku je dosaženo při aplikaci v bezplodném včelstvu. Jsou doporučeny dvě podzimní aplikace.

Aplikace v cukrovém sirupu se bryndá na horní loučky plástů, popř. přímo na včely, ideálně tak, aby včely nebyly v zimním chomáči. Včely si sirup s kyselinou předávají, čímž dochází k distribuci léčiva ve včelstvu. Ve dvou aplikacích by mělo být podáno 25-35 ml roztoku (Fries, 2000).

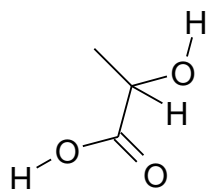
Při aplikaci pomocí speciálně vyvinutého zařízení dochází k zahřátí, ztekucení a následnému odpaření substance kyseliny. Ta vytváří na povrchu včel a úlu vrstvu jemných krystalků. Na jeden nástavek se používá 1 g kyseliny šťavelové.

Účinnost: aplikovaná postřikem na plásty vykazuje smrtnost roztočů 82-99 % (Imdorf, 1997; Floris, 1998). Nanetti (1999) se snažil ve své studii optimalizovat účinnost versus negativní účinky na včely. Použití 3,2% kyseliny šťavelové v 60% cukrovém sirupu vykazovalo 92,2% účinnost. 4,2% kyselina šťavelová vykazala lepší účinnost, ale nepříznivější účinky na včelstvo, 2,9 ml sirupu na stranu plástu bylo efektivnější než 2,5 ml na sirupu na stranu plástu.

Nežádoucí účinky: Higes (1999) ve své studii sleduje dlouhodobé účinky na včelstva po aplikaci kyseliny šťavelové, které se projevují hlavně špatnou kondicí včelích matek a jejich kratším přežitím.

Maximální reziduální hodnoty: nebyly stanoveny, chuť medu je ovlivněna při koncentracích nad 400-900 mg/kg v závislosti na druhu medu (Boganov, 1999).

### 1.3.2.3 Kyselina mléčná



Obr. 6: kyselina mléčná



Tato kyselina se používá v 15% koncentraci a je aplikována postřikem v množství 5-6 ml na každou stranu ráмку za použití vhodného vyvíječe aerosolu např. takového, jaký se používá k ošetření ovocných stromů. Jsou doporučována dvě ošetření po sobě následující (Imdorf, 1996).

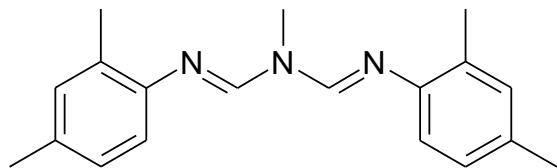
Účinnost: Kyselina mléčná aplikována postřikem na včely v podzimním období snížila populaci roztoče o 83-99 % (Kraus, 1992, 1994). Ve srovnávací studii usmrtila kyselina mléčná pouze 68,5 % roztočů v porovnání s kyselinou mravenčí, jejíž účinnost byla 91,7 % (Eguaras, 1996). Jarní ošetření podle Frilliho (1991) vykazuje účinnost pouze 41 %.

Nežádoucí účinky: ve vyšších dávkách (8 ml na jednu stranu ráмку) dochází ke ztrátě 60 % vajíček (Kraus, 1992). Při dvou ošetřeních následujících dva dny po sobě se zvýšila úmrtnost včel 4x a následně se vrátila k normálu (Kraus, 1991). Při dávkování, které je doporučeno jsou nežádoucí účinky srovnatelné s použitím kumafosu, ať už při jarním nebo podzimním ošetření (Kraus, 1994). Podle výsledků publikovaných Greattim (1992) způsobuje kyselina mléčná výrazně nižší smrtnost včel oproti kyselině mravenčí.

Rezidua: koncentrace, které byly naměřeny následně po aplikaci této kyseliny se pohybovaly do 1500 mg/kg medu, po čtyřech týdnech poklesly na koncentrace 500 mg/kg. Průměrné hodnoty kyseliny mléčné přirozeně se vyskytující v medu jsou do 200 mg/kg (Stoya, 1987). Podle doporučení Bogdanova (1999) je vhodné používat ošetření kyselinou mléčnou při podzimním ošetření a na jaře nejdéle čtyři týdny před začátkem snůšky.

Maximální reziduální hodnoty: přestože se kyselina mléčná vyskytuje v medu přirozeně, použití kyseliny mléčné jako akaricidu s sebou přináší i zvýšení její koncentrace v medu. Při koncentracích nad 800-1600 mg/kg medu je již patrná její chuť v medu v závislosti na jeho přirozeném aroma a chuti. Ve vosku se kyselina mléčná přirozeně nevyskytuje.

### 1.3.3. Amitraz



**Obr. 7: amitraz**

Amitraz, jako jediný zástupce ze skupiny formamidinů, je jednou z prvních látek používaných k tlumení varroázy (Merrington, 1990), v České republice se používá od roku 1984. Plastové pásky impregnované touto látkou, tedy jako kontaktní aplikace, vykazovaly mortalitu roztoče 97-99 % (Baxter, 1999). Ve formě postřiku vykazoval účinnost 90-96 % (Lodesani, 1990). Podle Hendersona (1988) dosahuje fumigační účinnost až 99 %.

Metody aplikace:

a/ plastový pásek impregnovaný účinnou látkou v dávce 500 mg/proužek (např. u nás neregistrovaný preparát Apivar) se aplikuje zavěšením mezi rámký, jeden proužek na 5 rámků, včely přichází do kontaktu s léčivem a roznášejí ho mezi ostatní. Doba aplikace až 6 týdnů.

b/ fumigace - několik kapek (2 na obsednutý nástavek) se nakape na proužek filtračního papíru, který je impregnovaný dusičnanem draselným a nechá doutnat v prostoru úlu (Varidol FUM). Obsah léčiva je 625 mg/5 ml roztoku. Dávka obsahuje 6 mg amitrazu.

c/ aerosol - tato aplikační forma je určena k ošetření včelstev v zimním období, pomocí kompresoru je aerosol vháněn česnem do prostoru úlu (Varidol AER).

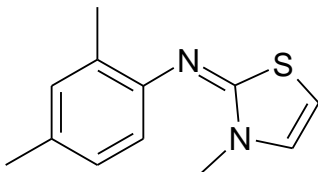
Nežádoucí účinky: byla popsána zvýšená úmrtnost 1-3 denních larev - 61 % vs. 83 % u kontroly (Bah, 1999). U aplikace fumigací bylo popsáno opuštění úlu včelami, zřejmě jako důsledek úniku před "požárem" (Lupo, 1990). Předávkování může vyvolat zvýšené vzrušení až hnutí včel (Varidol FUM). Experimentální injekční intraabdominální podání amitrazu (0,25 nmol na včelu) vyvolalo hypertrehalosemii a hyperglukosemii, účinek byl blokován alfa-blokátory, amitraz má při celkovém podání účinky alfa – adrenomimetické (Cascino, 1989).

Rezidua: Ačkoli se jedná o lipofilní látku, je amitraz poměrně těkavý a nestabilní. V medu se rozkládá během 3-4 týdnů (Jimenez, 1997). Amitraz proto není v medu přítomný jako reziduum (Lodesani, 1992). Včelí vosk urychluje rozklad amitrazu, po aplikaci není detekovatelný v řádu hodin, fluvalinat a kumafos nepodléhají rozkladu (Fries, 1998). Jako degradační produkty byly identifikovány 2,4 – dimethylphenylformamid a N-(2,4 – dimethylphenyl) - N'-methylformamidin (Korta et al. 2001).

Maximální reziduální hodnoty pro amitraz v medu se pohybují od 0,01 ve Švýcarsku do 1 mg/kg v USA. V zemích EU je povoleno maximálně 0,2 mg/kg (Wallner, 1999). Pro vosk reziduální hodnota stanovena nebyla, protože ve vosku nalezen nebyl.

Rezistence *V. destructor* : Rezistence k amitrazu byla popsána v USA, kde byla zkřížená s rezistencí k fluvalinatu (Elzen, 1999). Jako možný mechanismus rezistence je uváděna alterace oktopaminového receptoru a aktivace monoaminoxidázy (Jonsson, 2007).

#### 1.3.4. Cymiazol



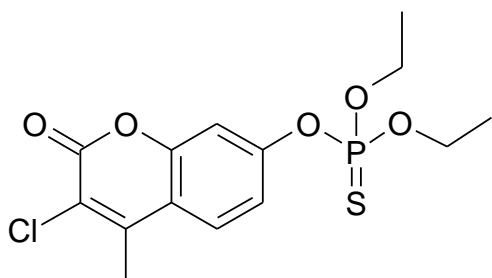
**Obr. 8: cymiazol**

Chemicky se jedná o iminophenylthiazolidinový derivát, který se míchá s glukózovým sirupem, kterým se včely krmí. Jsou doporučovány dvě aplikace po sedmi dnech. Roztoče hubí nasátím hemolymfy včel, která obsahuje akaricidní koncentraci účinné látky (Eyrich, 1990). Účinnost preparátu se pohybuje u bezplodých včelstev mezi 83-98 % (Woo, 1993).

### 1.3.5. Organofosfáty

Mechanismus účinku této skupiny léčiv spočívá v irreverzibilní inhibici acetylcholinesterázy a následné depolarizaci nervosvalových synapsí.

#### 1.3.5.1. Kumafos



**Obr. 9: kumafos**

Tato účinná látka je registrována pod obchodními názvy Check-Mite+ a Perizin. Check-Mite+ je plastový proužek vyrobený z polymeru napuštěný 10% roztokem účinné látky. Aplikuje se jeden proužek na každých pět rámků tak, aby byl přístupný včelám z obou stran a ty se s ním dostaly do maximálního kontaktu. Doba aplikace je 6 týdnů. Perizin je roztok kumafosu, který se aplikuje přímo na včely, nejlépe na podzim nebo v zimě, ve včelstvu by neměl být přítomen plod. Je doporučeno ošetřit včelstvo dvakrát po týdnu (Ritter, 1986). Perizin je přítomen v hemolymfě včel po dobu maximálně 12 hodin po jeho požití (Buren, 1992). Účinnost se pohybuje u pásků mezi 85-97 % (Baxter, 1999), u roztoku mezi 88 – 99 % (Frilli, 1991). Toxicita účinné látky pro včely je poměrně nízká ( $LD_{50}$  je 14,39  $\mu$ g).

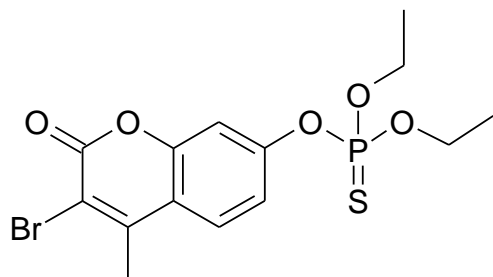
Rezidua: Vzhledem k tomu, že se jedná o látku, která není těkavá a rozpouští se v tucích, může se dostávat do vosku a odtud do medu. Kumafos je nejčastěji se vyskytující akaricid v německém medu (Wallner, 1999). Účinek kumafosu přítomného ve včelím vosku byl zkoumán Friesem (1998), při jeho koncentracích 10 mg/kg zvýšil

významně úhyn roztočů po prvním plodování. Košilký včel, které zanechávají včely v buňce po vylíhnutí, však bohužel zabraňují proniknutí akaricidu z vosku do dalšího nakladeného plodu, čímž se účinek látky vytrácí.

Karazafiris et al. (2008) stanovovali koncentrace kumafosu při a po použití proužků CheckMite+ v různých částech úlu v medu. V medu z medníku se koncentrace pohybovaly mezi 0,006 a 0,02 mg/kg, v medu z bezprostřední blízkosti pásky byly naměřeny koncentrace 0,06 – 0,111 mg/kg a rezidua byla detekovatelná do 103 dní po aplikaci.

Minimální reziduální koncentrace: tyto koncentrace se pohybují od 0,01 ve Švýcarsku do 0,05 mg/kg medu v Holandsku. Evropská unie má stanovenou maximální reziduální koncentraci v medu 0,1 mg/kg. Ve Spojených státech je maximální normou povolená koncentrace kumafosu 0,01 mg/kg v medu a 100 mg/kg vosku (Anon, 2000).  
Rezistence: dosud není prokázána.

#### 1.3.5.2. Cekafix



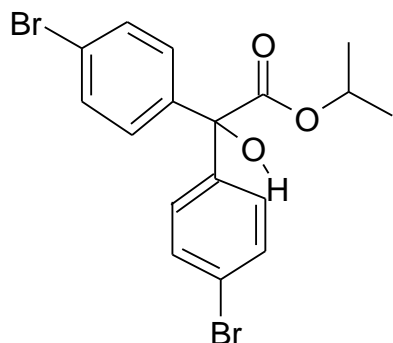
**Obr. 10: Cekafix**

Tato látka je bromovaným analogem kumafosu. Aplikuje se bryndáním emulze vzniklé smísením 1 ml léčiva s 25 ml cukerného sirupu, výrobce doporučuje maximálně dvě aplikace následující 7 dní po sobě.

Rezidua: Je doporučeno neaplikovat později než 6 týdnů před sklizní medu. Vzhledem k charakteru látky lze předpokládat rezidua v medu a vosku. Reziduální koncentrace nebyla stanovena.

Rezistence: dosud není prokázána (in Cushman, 2005).

### 1.3.6. Bromopropylat



**Obr. 11: bromopropylat**

Chemicky se jedná o isopropylester kyseliny dibrombenzilové dostupný pod registrovanou ochrannou značkou Folbex VA patentovaný v roce 1967 (Merck Index, 1996). Používá se ve formě fumigantu - čtyři aplikace po čtyřech dnech v období mimo snůšku a období, kdy jsou včely v zimním hroznu.

Účinnost se pohybuje nad 90 % (Santas, 1989). V porovnání s Apistanem (fluvalinat) je však jeho účinnost nižší (Khanbash, 1998). V přítomnosti plodu je jeho účinnost pouze 55 % (Alonso de Vega, 1990).

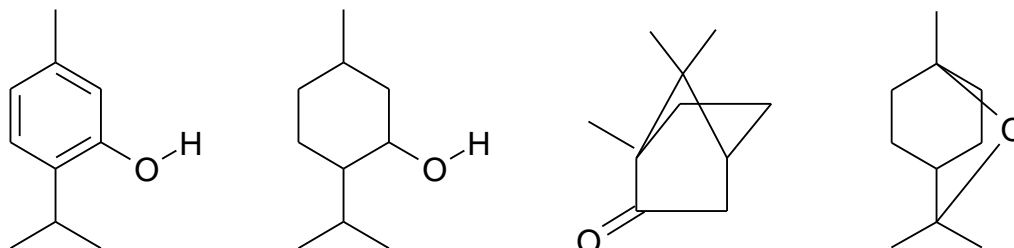
Rezidua: bromopropylat vytváří depozita ve včelím vosku. V roce 1987 byl přítomen ve 22 z 50 vzorků německého medu (Laub, 1987). Přestože se léčivo přestalo používat 8 let před tím, 11 % vzorků testovaných v roce 1996 mělo detekovatelnou hladinu tohoto léčiva mezi 0,002 - 0,01 mg/kg medu (Wallner, 1999). Bromopropylat se kumuluje ve vosku a měl více než 2x větší koncentraci ve včelstvech ošetřených jednou ročně po dobu 5 let než v koloniích ošetřených pouze jednou (Bogdanov, 1997). Vysoké hladiny (56,9 mg/kg) ve vosku byly nalezeny ve srovnání s fluvalinatem a kumafosem. Látka byla nalezena i ve znovu zpracovaném vosku, přestože nebyl tento preparát používán. Poločas léčiva jako rezidua vosku byl vypočten na 4 roky (Bogdanov, 1995).

Maximální reziduální koncentrace pro bromopropylat v medu jsou 0,01 mg/kg v Itálii, do 1 mg/kg v Německu a Švýcarsku. V Evropské Unii a USA nebyla dosud hodnota stanovena.

Rezistence byla potvrzena v laboratorních podmínkách (Ritter, 1988).

### 1.3.7. Monoterpeny

#### 1.3.7.1. Thymol



**Obr. 12: thymol, menthol, kafr a eukalyptol**

Thymol je látkou, která se vyskytuje v přírodě v éterických olejích některých druhů rostlin, např. *Thymus vulgaris* a *Origanum officinalis*, které jsou významnými léčivými rostlinami. Thymol se aplikuje různými způsoby, např. práškový thymol se rozptýluje přímo mezi rámky nebo se nechává odpařovat z porézních materiálů umístěných na horní loučce. V zásadě se uvádí dvě až čtyři ošetření, při kterých se aplikuje množství kolem 8-15 gramů na jedno ošetření a včelstvo.

Apiguard - nová, v Anglii patentovaná, formulace thymolu, je založena na jeho aplikaci v gelovém nosiči, poskytuje lepší kontrolu odpařování látky. Účinnost ošetření se pohybuje mezi 68-82 % (Mattila, 1999), podle jiné studie 76 % (Mattila, 2000). Prodloužení doby aplikace na 30 dnů nezvýšilo jeho účinnost; autor však nepoužil přípravek v podletí, jak je doporučováno. Optimální aplikační teplota činí 15-20 °C a pro optimální efekt je třeba, aby včelstvo bylo bez zavíčkovaného plodu. Obsahuje 50 g gelu, který se aplikuje dva týdny za sebou, nejlépe na konci včelařské sezóny při teplotách přesahujících 15 °C. Čistý thymol byl zkoušen v několika studiích s účinností 54-98 % (Marchetti, 1984; Gal, 1992; Higes, 1996).

### 1.3.7.2. Kombinace monoterpenů

V kombinaci s thymolem se aplikují i jiné monoterpeny, jako v patentovaném preparátu Apilife VAR, která obsahuje vedle thymolu i eukalyptol, menthol a kafr v tabletě. Účinnost tohoto preparátu se pohybuje nad 90 % (Imdorf, 1999), podle jiných studií je akaricidní účinek kolem 70 % (Calderone, 1999). Účinek tohoto preparátu je závislý na době odpařování (Calderone, 1995).

Mezi nežádoucí účinky patří ovlivnění přežití nezavíčkováného plodu (74-87 % vs. 89-95 % u kontroly) (Mattila, 2000/2). U preparátu Apilife VAR nebylo prokázáno nežádoucí ovlivnění včelstev (Liebik, 1993), avšak ve studii Moosbeckhofera (1993) byla popsána významná ztráta včel a nižší výnos medu v následující sezóně. Stejně tak Floris et al. (2004) uvádí signifikantní negativní účinek na včelstva.

Thymol i menthol vytváří ve vosku rezidua. Bogdanov (1998) doporučuje souše odvětrávat, což sníží jejich kontaminaci. Po podzimní aplikaci Apilife VAR byla rezidua mezi 0,02-0,48 mg/kg medu v následujícím roce. Floris (2004) uvádí rezidua v medu 0,12 – 4,03 mg/kg u Apilife VAR a 0,4 – 8,8 mg/kg u Apiguard. Ve vosku vysoká rezidua 21,6 a 147,7 mg/kg pro Apilife VAR, resp. Apiguard.

Maximální reziduální limit není stanoven. Bogdanov et al. (1999) uvádí, že při koncentracích nad 1,1-1,3 mg/kg dochází k chuťovému poškození medu. O rezistenci na thymol či menthol nejsou v literatuře zprávy.

### 1.3.8. Biologická léčba

Další, zatím víceméně experimentální možnosti boje proti varroáze, je použití hub, které zcela preferenčně napadají *V. destructor*. Peng et al. (2002) uvádí, že jen některé izoláty houby *Hirsutella thompsonii* mají schopnost zabít roztoče.  $LT_{50}$  – čas potřebný k usmrcení 50 % roztočů v laboratorních podmínkách, se pohyboval mezi 53 – 97 hodinami. Kanga et al. (2002) uvádí  $LT_{90}$  při úlové teplotě 9,9 dne pro *Hirsutella thompsonii* Fisher a 7,13 dne pro *Metarhizium anisopliae* Metschnikoff. V pokusných včelstvech se sporuláty šířily sociálním přenosem, i v kontrolních včelstvech byla nalezena necelá 3 % mrtvých roztočů infikovaných *Hirsutella thompsonii*. Pro včely byly



použité houby neškodné. O vlivu na včelí produkty se autoři nezmiňují.

### **1.3.9. Ostatní léčebné postupy**

#### **Rostlinný olej**

Emulze rostlinného oleje je používána buď ve formě směsi s cukrem nebo ve spreji. Její použití vede k úhynu 97 % roztočů, ale také až 50 % včel (Brodsgaard, 1994).

#### **Parafínový olej**

Ve studii byl aplikován s vhodným emulgátorem (Tween) ve formě postřiků 6-10 ml oleje na rámeček jedenkrát týdně, tři týdny po sobě. Úhyn včel po dvou aplikacích byl 97 % a po třetí aplikaci 99,5 % oproti kontrole (Le Conte, 1998).

#### **Olej z *Azadirachta indica* – Zederach indický**

Emulgovaný Tweenem v dávce 400 ml na včelstvo ve formě spreje usmrtil 50-90 % roztočů do 48 hodin s méně než 10 % mortalitou včel. Vykázal však nižší účinnost než fluvalinat (Apistan), jeho účinnost však byla srovnatelná s kyselinou mravenčí (Melathopoulos, 2000).

#### **Olej z *Gaultheria procumbens* – Libavka poléhavá**

Hlavní obsahovou látkou oleje je methylester kyseliny salicylové. Bylo aplikováno 5 ml na včelstvo ve formě spreje. Odpaření 15 ml oleje vedlo k uhynutí 95 % roztočů a jen 7 % včel v laboratorních podmínkách. Při pokusu na stanovišti, kde byla včelstva ošetřena libavkovým olejem s následným 15 minutovým zahřátím, byla mortalita roztočů mezi 55-82 % (Hoppe, 1990). V jiné studii stejný způsob ošetření vedl k úhynu 31 % dospělých včel po 5 dnech aplikace a 60% varrocidnímu účinku (Bunsen, 1992).

**Tab 1: Souhrnný přehled látek používaných ke kontrole varroázy**

<u>účinná látka</u> dávka/apli- kace/včelstvo	obchodní název	účinnost %	frekvence použití	nežádoucí účinky	rezidua	rezistence
<u>Fluvalinat</u> F =A: 1 mg P: 180 mg	F:MP10FUM*,Mavrick A:M1 AER** P:GabonPF90*,Apistan,	95-99, (30-50 rezistentní populace)	P: až 42 dní	minimální	med, vosk, propolis	zkřížená s ostatními pyretroidy
<u>Akrinatriin</u> 3 mg	P: Gabon PA92*	92	P: až 30 dní	minimální	nejsou	zkřížená s ostatními pyretroidy
<u>Flumetrin</u> 7,2 mg	P:Bayvarol	95-99	P: až 42 dní	minimální	propolis	zkřížená s ostatními pyretroidy
<u>Kys. mravenčí</u> 60-85%,30- 120ml	BeeVar, Apicure gel Nassenheider Formidol*	61-98	různě	plod, ztáta matky	med - chuť	ne
<u>Kys.šťavelová</u> 1-2 g	sprej, sirup, odpar - Varrox	82-99	podzim	plod	med - chuť	ne
<u>Kys.mléčná</u> 3 g	sprej	41-99	2-4x ročně	plod	med-chuť	ne
<u>Amitraz</u> P: 1g F=A: 6mg	P: Apivar A: Variol AER* F: Variol FUM*, Taktik Sprej:Mitac	90-99	P: až 42 dní	minimální	ne	zkřížená s pyretroidy
<u>Cymiazol</u>	Apitol sirup	83-98	2 x 1 týden	plod	ne	ne
<u>Kumafos</u> <u>Cekafix</u> P: 32 mg	P:Checkmite+ Perizin roztok	85-97 88-99	P: až 42 dní 2 x 1 týden	včely	med, vosk	snížení citlivosti
<u>Bromopropylat</u> F: 5mg	F: Folbex	55-99	4x 4dny	ne	med, vosk	v laboratorních podmínkách
<u>Monoterpeny</u> 8-15g thymolu	Apiguard Apilife VAR	54-98	2x 2 týdny	minimální	med, vosk	ne
<i>Hirsutella thompsonii, Metarhisiium anisopliae</i>	není	až 83	standardní postup není stanoven	ne	?	?

**Pozn.: \* Léčiva registrovaná v ČR, \*\* lze použít i na jarní nátěr plodu**  
**F: fumigace, A: aerosol, P: proužek**

## **2. Experimentální část**

### **2.1. Materiál a metodika**

Ověření bylo uskutečněno na deseti včelstvech rámkové míry 39x24, která obsedají 8-12 plástů na stanovišti Jenišovice u Turnova. Jednotlivá včelstva byla očíslována. Chov je v mém vlastnictví.

Thymol ČL 2002 a kyselina mravenčí 85% čistá byly pořízeny od firmy Dr. Kulich. Odparné desky, Gabon PA 92, Varidol FUM a fumigační pásy, sítě polynet pro přípravu síťových podložek byly pořízeny z Výzkumného ústavu včelařského, Dol.

Odparné desky jsou vyrobeny z krátkovláknité celulózy, deska je opatřena plastovým obalem s pěti otvory (regulační obal), který se odstraní zpravidla po 48 hodinách od vložení odparné desky do včelstva. V úvodní fázi odparu otvory přiléhají k odparné desce a omezují tak počáteční intenzivní odpar. Postupným vysycháním se deska zkroučí, otvory se oddálí od odparné desky a uvolňování kyseliny opět stoupne. V návazné fázi, tedy po 48 hodinách, se odstraní regulační obal a dojde ke krátkodobě zvýšené koncentraci kyseliny mravenčí v úlu (Formidol a.u.v., příbalová informace).

#### **2.1.1. Způsob přípravy experimentálních odparných desek**

Odparné desky s kyselinou mravenčí

40 ml 85% kyseliny mravenčí bylo stříkačkou aplikováno na celulóзовou odparnou desku. Léčivo bylo zataveno do mikrotenového sáčku (vnější obal) a řádně označeno. Takto připravené desky jsou materiálem, koncentrací a aplikovaným množstvím kyseliny adekvátní registrovanému přípravku Formidol a. u. v.

Odparné desky s kyselinou mravenčí a thymolem

40 ml 85% kyseliny mravenčí bylo ve varné baňce smícháno s 8 g thymolu. Suspenze byla zahřáta mírně nad bod varu thymolu (52 °C), thymol se rozpustil a za stálého

míchání ochladil. Vzniklá emulze byla stříkačkou aplikována na odparnou desku. Léčivo bylo zataveno do mikrotenového sáčku (vnější obal) a označeno.

### **2.1.2. Plán experimentu:**

**1.-7. den** - u všech včelstev byl sledován přirozený spadu roztočů na síťových podložkách po dobu sedmi dní.

**7. den** - byla odebrána měl ze síťových podložek, stanoven přirozený spad roztoče (počet roztočů v tabulce označen PS). Podložky byly očištěny a vloženy zpět do včelstev, ta byla rozdělena do dvou skupin po pěti včelstvech. Odparné desky byly vloženy na horní loučky plástů tak, aby otvory směřovaly do plástových uliček, do pěti včelstev (číslo 1-5) s kyselinou mravenčí, do ostatních (číslo 6-10) s kyselinou mravenčí a thymolem.

**9. den** - po 48 hodinách od vložení odparných desek byl odstraněn vnitřní obal odparné desky tak, jak je doporučeno výrobcem u přípravku Formidol. Odparné desky byly ve včelstvech ponechány celkem 7 dní.

**14. den** - byly odstraněny odparné desky, byl zaznamenán spad roztočů, síťové podložky očištěny a vloženy zpět do včelstva (hodnota v tabulce označena FA - FA/T). U všech včelstev byla provedena fumigace přípravkem Varidol FUM (dvě kapky na obsednutý nástavek). Včelstva byla po aplikaci uzavřena 1 hodinu.

**15. den** – byl stanoven spad roztočů, kteří zůstali po aplikaci odparných desek ve včelstvu a byli později zahubeni Varidolem FUM (tedy všichni roztoči mimo zavíčkovaný plod, hodnota v tabulce označena V-FUM). Opět vloženy očištěné síťové podložky a do každého včelstva byly aplikovány 2 pásy Gabon PA 92 na 14 dní, v této fázi experimentu by se měli všichni roztoči, kteří jsou v zavíčkovaném plodu vylíhnout spolu se včelami a dostat se do kontaktu s akaricidem.

**29. den** – byl stanoven spad roztočů ( hodnota v tabulce označena PA 92)

## 2. 2. Výsledky

**Tab 1 : Množství roztočů *Varroa destructor* nalezených na síťových podložkách v jednotlivých fázích experimentu**

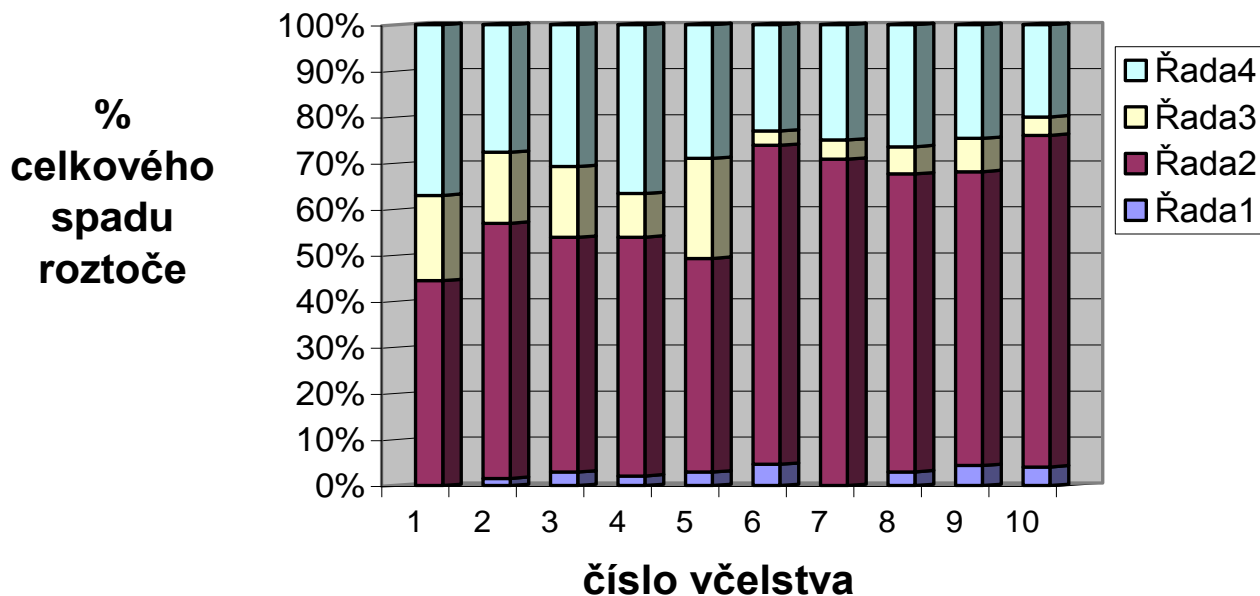
Včelstvo	PS	FA – FA/T	V- FUM	PA 92	celkem	% FA – FA/T
1	0	12	5	10	27	44
2	1	36	10	18	65	55
3	3	53	16	32	104	51
4	5	126	23	89	243	52
5	2	32	15	20	69	46
6	3	45	2	15	65	69
7	0	17	1	6	24	70
8	1	22	2	9	34	65
9	3	44	5	17	69	64
10	2	36	2	10	50	72
<b>median</b>	<b>2</b>	<b>53/36</b>	<b>15/2</b>	<b>20/10</b>	<b>69/50</b>	<b>51/69</b>

**Vysvětlivky:** **PS** – přirozený spad, **FA – FA/T** - spad po aplikaci odparných desk s kyselinou mravenčí (včelstva číslo 1-5) nebo její kombinace s thymolem (včelstva číslo 6-10), **V – FUM** - spad po fumigaci Varidolem, **PA 92** - spad po aplikaci Gabonu PA 92, **%FA – FA/T** - procentuelní podíl FA – FA/T na celkovém spadu, **median** – první hodnota pro včelstva 1-5, za lomítkem pro včelstva 6-10

Vzhledem k poměrně malému množství dat jsem se rozhodl nestanovovat směrodatnou odchylku, ale medián hodnot, který dle mého lépe vystihne statistické poměry daného souboru dat. Z hlediska pravděpodobnosti byl soubor dat vyhodnocen Studentovým T-testem. Byly porovnávány soubory včelstev 1-5 vs. 6-10 tedy FA vs. FA/T. Pro

statistickou analýzu bylo použito oboustranné rozdělení, dva výběry s různým rozptylem  
-  $p = 0,099$ .

**Graf 1: Vliv kyseliny mravenčí (včelstva 1-5) a její kombinace s thymolem (včelstva 6-10) na spad roztoče *Varroa destructor***



**Vysvětlivky:** řada 1 – přirozený spad, řada 2 - spad po aplikaci odparných desek s kyselinou mravenčí (včelstva číslo 1-5) nebo její kombinace s thymolem (včelstva číslo 6-10), řada 3 - spad po fumigaci Varidolem, řada 4 - spad po aplikaci Gabonu PA 92

Z výsledků plyne, že spad roztoče *V. destructor* po aplikaci kyseliny mravenčí samotné byl 51 % z celkové populace roztočů, v kombinaci kyseliny mravenčí s thymolem 69 % ( $p = 0,099$ ).

## 2.2. Diskuse

V experimentální části práce byl sledován akaricidní účinek kyseliny mravenčí a její kombinace s thymolem. Studie, která by se zabývala zjišťováním účinku této kombinace léčiv nebyla v literatuře nalezena. Tato léčiva byla vybrána z důvodu ověření vzájemného účinku těchto látek, protože, jak se zdá, jejich mechanismus účinku je odlišný. Navíc se jedná o látky, které mají poměrně malou toxicitu a relativně málo se ukládají ve včelích produktech – v tomto ohledu je třeba věnovat pozornost thymolu pro jeho možnou kumulaci ve vosku. Z výsledků experimentu vyplývá, že kombinace těchto léčiv je přínosná – zvýšení účinku kyseliny mravenčí v kombinaci s thymolem dosáhlo 18 %. Je otázkou, zda za tímto účinkem nestojí působení thymolu samotného, vždyť podle literatury se jeho účinnost pohybuje mezi 54 až 98 %. Na tuto otázku by odpověděla extenze studie ideálně s další skupinou včelstev, které by byl jedné skupině včelstev podáván thymol samostatně. Je otázkou v jaké formě by měl být thymol podáván. S výhodou jsem využil emulzi, kterou thymol po jeho zahřátí nad teplotu tání s kyselinou mravenčí tvoří, což zajišťuje bezpečnost při manipulaci, oproti manipulaci s krystalickým thymolem. Vhodná by dle mého názoru byla i gelová formulace Apiguard.

Ideální antivarroatikum by mělo mít co nejvyšší možnou akaricidní účinnost, přitom vysokou bezpečnost pro včely, rezidua by naopak měla být minimální, popř. žádná, v žádném případě by se léčivo nemělo kumulovat. Z hlediska aplikační formy a ekonomie včelařského provozu je optimální jednorázová aplikace léčiva bez nutnosti zasahovat do včelstva např. jeho rozebráním. S přihlédnutím k moderním požadavkům a dostupným přípravkům a jejich aplikačním formám lze uvažovat o aplikaci fumigací (Varidol FUM), při použití kompresoru též aerosol (Varidol AER), vložení odparné desky (Formidol) a odparných tablet (Apilife VAR). Pásy (Gabon) je třeba vkládat mezi plodové rámy, což již představuje časovou zátěž. Stejně tak příprava léčebného sirupu a jeho aplikace - krmení také vyžaduje více času (kyselina šťavelová). Asi nejméně optimální z hlediska pohodlnosti aplikace a času potřebnému k ošetření včelstev je nátěr plodu (M 1 AER) a postřik včel (kyselina šťavelová a mléčná). Nutno poznamenat, že stejně jako u lidí, nesnadná aplikace snižuje compliance v tomto případě nikoliv včel, ale

včelařů! Z hlediska reziduí je dle literatury upřednostňováno používání „soft“ léčiv, tedy těch, které jsou v určitých koncentracích přirozenou součástí včelích produktů, zejména medu. Jedná se o organické kyseliny (mravenčí, mléčná, šťavelová) a monoterpeny (thymol, menthol, eukalyptol, kafr). Nevýhodou těchto látek je ale relativně nižší účinnost a tedy pokud by se našel někdo, kdo by chtěl jít „čistě přírodní cestou“ – ex bona fides - a přitom efektivně zasáhnou proti varroáze, musel by ošetření opakovat vícekrát. Je otázkou rozsáhlé diskuze, zda ovšem koncentrace těchto „čistě přírodních látek“ nebudou mnohonásobně překračovat hygienické limity a co více, med s příchutí thymolu či lehce štiplavé kyseliny mravenčí, jistě nebude označený jako produkt zdravé výživy. Ve prospěch této skupiny léčiv mluví také dosud neprokázaná rezistence *V. destructor*. Proti použití organofosfátů (kumafos, Cekafix) hovoří jejich kumulace ve včelích produktech a možný vznik rezistence, navíc jejich poměrně vysoká toxicita pro včely. Rezidua jsou závažným problémem také u bromopropylatu (Folbex). Organofosfáty ani bromopropylat nejsou v České republice používány.

Z hlediska účinnosti tlumení nákazy roztočem *V. destructor* patří mezi nejúspěšnější látky ze skupiny syntetických pyretroidů (fluvalinat, flumetrin, akrinatriin) a formamidin amitraz. Účinnost těchto látek vesměs převyšuje 90 % nezávisle na způsobu aplikace. Tyto látky také patří mezi léčiva s příznivým bezpečnostním profilem. Jejich jedinou nevýhodou je možnost vzniku rezistentních subpopulací roztoče, což vede ke ztrátě použitelnosti velmi hodnotných preparátů.

Bezpečností léčiv používaných k tlumení varroázy včel se zabývá Wahida Loucif – Hyad (2008). Je zde sledována aktivita enzymů acetylcholinesterázy - AChE a glutathion S – transferázy - GST po podání amitrazu, flumetrinu a thymolu v různých vývojových stádiích včel. V aktivitě AChE nebyl patrný signifikantní rozdíl oproti kontrolní skupině. Aktivita GST byla zvýšena u larev a kukel oproti kontrole, zřejmě jako důsledek toxického stresu vývojových stádií včel.



### 2.3. Závěr

V této práci byly shrnuty dostupné fyzikální i farmakologické poznatky o léčivých látkách použitelných pro kontrolu varroázy včel. V praktické části jsem se pokusil zjistit přínos kyseliny mravenčí ve formě odparných desek a její kombinaci s thymolem na spad roztoče *V. destructor*. Z výsledků plyne, že akaricidní účinek po jedné aplikaci kyseliny mravenčí samotné byl 51% celkové populace roztočů, v kombinaci kyseliny mravenčí s thymolem 69% ( $p = 0,099$ ). U originálního přípravku Formidol a. u. v. je uvedeno, že jedno ošetření sníží populaci roztočů asi na polovinu. Tento výsledek je tedy v souladu s účinností uváděnou výrobcem. O kombinaci kyseliny mravenčí s thymolem neexistují dostupné publikované údaje. V experimentální části této rigorózní práce byl prokázán přínos vzájemné kombinace obou látek – nárůst účinnosti o 18 %. K ověření tohoto poznatku by bylo třeba zajistit větší statistický soubor dat – tedy včelstev, na kterých by bylo potvrzeno či vyvráceno pozorování v této práci uvedené.

### 3. Literatura:

Alonso de Vega, F., Ruguera, O.: Field trial of two products, Perizin and Folbex VA, for the treatment of varroa disease in honey bees. *Medicina Veterinaria* 1990, 7 (1), 35-41

Anderson, D., Trueman, J.W.H.: *Varroa jacobsoni* is more than one species. *Experimental and Applied Acarology* 2000, 24, 165-189

Anon, J.: EPA sets tolerance levels for Coumaphos. *American Bee Journal* 2000, 140 (10), 778

Bah, M.: Influence of some anti-varroa drugs on bee brood. *Medycyna Weterynaryjna* 1999, 55 (11), 769-771

Balayannis, P., Santas, L.: Dissipation of malathion and fluvalinate residues in honey. *Journal of Apicultural Research* 1992, 31 (2), 70-76

Baxter, J.R., Ibarra, J., Wilson, W.T.: Amitraz or coumaphos efficacy test in Guatemala for control of *Varroa jacobsoni* in honey bee. *Southwestern Entomological Society* 1999, 309-313

Bernal, J.L, Jiménez, J.J, del Motal, M.J., Higes, M., Llorente, J. : Gas chromatographic determination of acrinathrine and 3-phenoxybenzaldehyde residues in honey. *Journal of Chromatography A* 2000, 16, 882 (1-2), 239-43

Bogdanov, S., Kilchenmann, V.: Acaricide residues in beeswax: long-term studies in Switzerland. *Apidologie* 1995, 26 (4), 319-321

Bogdanov, S., Kilchenmann, V., Imdorf, A.: Acaricide residues in beeswax and honey. *Bee Products: Properties, Applications, and Apitherapy*. New York, Plenum Press 1997, 239-246

Bogdanov, S., Imdorf, A., Kilchenmann, V.: Residues in wax and honey after Apilife VAR treatment. *Apidologie* 1998, 29 (6), 513-524

Bogdanov, S., Kilchenmann, V., Fluri, P., Buhler, U., Lavanchy, P.: Influence of organic acids and components of essential oils on honey taste. *American Bee Journal* 1999, 139 (1), 61-63

Borneck, R., Merle, B.: Expediments with Apistan in 1988. *Apiacta* 1990, 25 (1), 15-24

Bowen - Walker, P.L.: The transmission of deformed wing virus between honeybees (*Apis mellifera* L.) by the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud., *J. Invertebrate Pathology* 1999, 73 (1), 101-106

Brodsgaard, C., Kristiansen, P., Hansen, H.: Efficacy of vegetable oils as soft chemical

acaricides against *Varroa jacobsoni* infesting honey bees. IX International Congress of Acarology 1994

Bunsen, J.D.: Experimental studies on the control of the mite *Varroa jacobsoni* Oud, an ectoparasite of honey bee (*Apis mellifera* L.), with materials of natural origin dissertation, Justus-Liebig University, Giessen, Germany 1992

Buren, N., Marien, A., Velthuis, H.: The role of trophallaxis on the distribution of Perizin in a honey bee colony with regard to the control of the varroa mite. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 1992, 65 (2), 157-164

Calderone, N.W.: Evaluation of formic acid and a thymol-based blend of natural products for the fall control of *Varroa jacobsoni* in colonies of *Apis mellifera*. *Journal of Economic Entomology* 1999, 92, 253-260

Calderone, N.W.: Evaluation of a formic acid formulation for the Fall control of *Varroa jacobsoni* in colonies of the honey bee *Apis mellifera* in a temperate climate. *Journal of Economic Entomology* 1999, 92 (3), 526-533

Calderone, N.W., Spivak, M.: Plant extracts for control of the parasitic mite *Varroa jacobsoni* in colonies of the western honey bee. *Journal of Economic Entomology* 1995, 88 (5), 1211-1215

Calderone, N.W.: Evaluation of drone removal for management of *V. destructor* in colonies of *Apis mellifera* in the northeastern United States. *Journal of Economic Entomology* 2005, 98 (3), 645-650

Cascino, P., Nectoux, M., Guiraud, G., Bounias, M.: The formamidine amitraz as a hyperglycemic alpha – agonist in worker honeybees in vivo. *Biomedical and Environmental Science* 1989, 2 (2), 106-114

Correa - Marques, M.H, De Jong, D.: *Varroa* - tolerant Italian honey bees from Brazil were not more efficient in defending themselves against the mite *V. destructor* than Carniolan bees in Germany. *Genetic and Molecular Research* 2002, 30, 1, 153-158

Currie, R. W.: Fluvalinate queen tabs for use against *Varroa jacobsoni* Oud.: efficacy and impact on honey bee, *Apis mellifera* L., queen and colony performance. *American Bee Journal* 1999, 139 (11), 871-876

Cushman, D.A.: Cekafix, instruction for application. [www.dave-cushman.net/bee/cekafix.html](http://www.dave-cushman.net/bee/cekafix.html) 2005

De Greef, M., De Wael, L., Van Laere, O.: The determination of the fluvalinate residues in the Belgian honey and beeswax., *Apiacta* 1994, 29 (4), 83-87

De Guzman, L. I., Rinderer, T. E., Lancaster, V.A., Delatte, G.T.: *Varroa* in the mating yard. III. The effects of formic acid gel formulation on drone production. *American Bee*

Journal 1999, 139 (4), 304-307

Delfinado, M.D.: Mites of honey bee in Southeast-Asia. J. of Apicultural Research 1963, 2, 113-114

Drijfhout, F.P.: Components of honeybee Royal Jelly as Deterrents of the Parasitic Varroa Mite, *V. destructor*, Journal of Chemical Ecology 2005, 31 (8), 1747-1764

Eguaras, M. Quiroga, S.: The control of *Varroa jacobsoni* by means of organic acids. Apiacta 1996, 31 (2), 51-54

Elzen, P.J., Baxter, J.R., Sivak, M., Wilson, W.T.: Amitraz resistance in varroa: new discovery in North America. American Bee Journal 1999, 139 (5), 362

Elzen P.J., Eischen, F.A., Barter, J.B., Pettis, J., Elzen, G.W.: Fluvalinate resistance in *Varroa jacobsoni* from several geographic locations. American Bee Journal 1998, 138 (9), 674-676

Eyrich, U., Ritter, W.: Distribution of a systemic functioning medicament in the body of the honey bee, *Apis mellifera*. Zeitschrift fur Angewandte Entomologie 1990, 109, 15-20

Fakhimzadeh, K.: Potential of super-fine ground, plain white sugar dusting as an ecological tool for the control of varroasis in the honey bee, American Bee Journal 2000, 140 (6), 487-491

Faucon, J.P., Drajnudel, P., Fleche, C.: Decrease in Apistan efficacy used against varroasis in the honey bee, Apidologie 1995, 26 (4), 291-296

Feldlaufer, M.F., Pettis, J.S., Kochansky, J.P., Shimanuki, H.: A gel formulation of formic acid for the control of parasitic mites of honey bees. American Bee Journal 1997, 137 (9), 661-663

Formidol a.u.v. příbalová informace, Výzkumný ústav včelařský Dol u Libčic nad Vltavou

Floris, I., Satta, A., Mutinelli, F., Pandin, L.: Efficacy of winter applications of oxalic acid against *Varroa jacobsoni* Oudemans in beehives in the Mediterranean area, Redia 1998, 81, 143-150

Floris, I., Satta, A., Cabras, P. Garau, V.L.: Comparison between two thymol formulations in the control of *V. destructor*: effectiveness, persistence and residues. Journal of Economic Entomology 2004, 97 (2), 187-195

Fries, I.: Treatment of sealed honey bee brood with formic acid for control of *Varroa jacobsoni*. American Bee Journal 1991, 131 (5), 313-314

Fries, I., de Ruijter, A.: Minutes of the 5th Meeting of the European Group for Integrated Varroa Control, Zollikofen, Switzerland 2000

Fries, I., Munn P., Jones, R.: Organic control of varroa. Varroa! Fight the Mite. London, IBRA 1997, 16-21

Fries, I., Wallner, K., Rosenkranz, P.: Effects on *Varroa jacobsoni* from acaricides in beeswax. Journal of Apicultural Research 1998, 37 (2), 85-90

Frilli, F., Milani, N., Barbattini, R., Greatti, M., Chiesea, F.: The effectiveness of various acaricides in the control of *Varroa jacobsoni* and their tolerance by honey bees. Proceedings of The Current State and Development of Research in Apiculture, Sassari, Italy 1991

Gal, H., Slabezki, Y., Lensky, Y.: A preliminary report on the effect of origanum oil and thymol applications in honey bee colonies in a subtropical climate on population levels of *Varroa jacobsoni*, Bee Science 1992, 2 (4), 175-180

Greatii, M., Iob, M., Barbattini, R.: Effectiveness of spring treatments with lactic acid and formic acid against *Varroa jacobsoni*, Apicoltore Moderno 1992, 83 (2), 49-58

Haupt, W., Ribeeck, R., Will, R., Hertzsch, K.: Results of the application of Bayvarol strips to honey bee colonies in multistorey and back-opening hives to control varroasis under field conditions. Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift 1996, 109 (6-7), 232-238

Henderson, C., Bowman, C.: Tests of chemical control agents for *Varroa jacobsoni* in honey-bee packages. Africanized Honey Bees and Bee Mites 1988

Higes, M., Meana, A., Suarez, M., Llorente, L.: Negative long-term effects on bee colonies treated with oxalic acid against *Varroa jacobsoni*, Apidologie 1999, 30 (4), 289-292

Higes Pascual, M., Suarez Robles, M., Llorente, M.: Test of the efficacy of thymol in the control of varroasis in the honey bee, Colmenar 1996, 1, 29-31

Hoppe, H.: Control of varroa with a thermal treatment in combination with wintergreen oil. Dissertation, Justus Liebig University, Giessen, Germany 1990

Charriere, J., Imdorf, A.: Was kann von der Oxalsäure gegen die varroa erwartet werden? Schweizerische Bienen Zeitung 1998, 121 (8), 505-506

Imdorf, A., Kilchenmann, V., Maquelin, C.: Optimal use of formic acid. Schweizerische Bienen Zeitung 1990, 113 (7), 378-385

Imdorf, A., Charriere, J.D., Maquelin, C., Kilchenmann, V.: Alternative varroa control, American Bee Journal 1996, 136 (3), 189-193

Imdorf, A., Charriere, J., Bachofen, B.: Efficiency checking of the *Varroa jacobsoni*

control methods by means of oxalic acid. *Apiacta* 1997, 32 (3), 89-91

Imdorf, A., Bogdanov, S., Ochoa, R.I.: Use of essential oils for the control of *Varroa jacobsoni* in honey bee colonies. *Apidologie* 1999, 30 (2-3), 209-228

Jimenez, J., Bernal, J., de Motal, M., Toribio, L.: Characterisation and monitoring of Amitraz degradation products in honey. *Journal of High Resolution Chromatography* 1997, 18, 81-84

Jonsson, N., Hope, M.: Progress in the epidemiology and diagnosis of amitraz resistance in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology* 2007, 146 (3-4), 193-8

Kanga, L.H., James, R.R., Boucias, D.G.: *Hirsutella thompsonii* and *Metarhizium anisopliae* as a potential microbial control agents of *V. destructor*, a honey bee parasite. *Journal of Invertebrate Pathology* 2002, 81 (3), 175-184

Karazafiris, E., Tananaki, C., Menkossoglu- Spiroudi, U.: Residue distribution of acaricide Coumaphos in honey following application of a new slow-release formulation. *Pest Management Science*, 2008, 64 (2), 165-71

Kevan, P.: Association of *Varroa jacobsoni* with organisms other than honeybees and implications for its dispersal. *Bee World* 1990, 71 (3), 119-121

Khanbash, M.S., Taleb, A. M. B.: Evaluation of some chemicals to control Varroa mite during the presence of brood in honeybee colonies. *University of Aden Journal of Natural and Applied Sciences* 1998, 2 (1), 13-20

Koeniger, N., Rau, C.: Field trials with formic acid against *Varroa jacobsoni* in Hochtaunuskreis 1979/1980. *Allgemeine Deutsche Imkerzeitung* 1980, 14 (5), 157-159

Korta, E., Bakkali, A., Berrueta, L.A., Gallo, B., Vicente, F: Study of acaricide stability in honey. Characterisation of amitraz degradation products in honey and beeswax. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001, 49 (12), 5835-42

Kramer, K.: Field trials with Kramer plates: numbers, facts, results and experiences. *Deutsches Imkerzeitung* 1991, 2 (3), 102-105

Kramer, K.: Formic acid for control of varroa in the honey bee colony. *Bienenwelt* 1993, 35 (2), 47-49

Kraus, B.: Lactic acid treatment as varroasis therapy: intermediate report on winter treatment. *Biene* 1991, 127 (8), 427-430

Kraus, B.: Further results on lactic acid application as treatment for varroastosis. *Apidologie* 1992, 23 (4), 385-387

Kraus, B., Berg, S.: Effect of a lactic acid treatment during winter in temperate climate upon *Varroa jacobsoni* Oud. and the bee (*Apis mellifera* L.) colony. *Experimental and Applied Acarology* 1994, 18 (8), 459-468

Laub, E., Metzler, B., Putz, A., Roth, M.: The residue situation for authorised *Varroa* control agents in honey. *Lebensmittelchemie und Gerichtliche Chemie* 1987, 41, 107-109

Le Conte, Y.: Action of the Parasitic Mite *Varroa* to the Drone Larvae of Honey Bees by Simple Aliphatic Esters. *Science* 1989, 11, 245, 638-639

Le Conte, Y., Colin, M., Paris, A., Crauser, D.: Oil spraying as a potential control of *Varroa jacobsoni*. *Journal of Apicultural Research* 1998, 37 (4), 293-294

Liebig, G.: *Varroa* control with Apilife VAR. *Schweizerische Bienen Zeitung* 1993, 116 (11), 630-633

Liebig, G.: Formic acid application with the Tellerverdunster and Medicine Bottle. *Bienenpflege* 1997, (2), 35-43

Liu, Z., Tan, J., Juany, Z.Y., Dong, K.: Effect of a fluvalinate-resistance-associated sodium channel mutation from *Varroa* mites on cockroach channel sensitivity to fluvalinate, a pyrethroid insecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2006, 36 (11), 885-9

Lodesani, M., Bergomi, S., Pellacani, A., Carpana, E.: A comparative study on the efficacy of some products for controlling *Varroa*, and determinations of their residues. *Apicoltura* 1990, 6, 105-130

Lodesani, M., Colombo, M.: Ineffectiveness of Apistan treatment against the mite *Varroa jacobsoni* Oud in several districts of Lombardy (Italy). *Apidologie* 1995, 26, 67-72

Lodesani, M., Pellacani, A.: Residue determination for some products used against *Varroa* infestation in bees. *Apidologie* 1992, 23 (3), 257-272

Lodesani, M.: Control strategies against *Varroa* mites, *Parassitologia* 2004, 46 (1-2), 277-9

Lubinevski, Y., Stern, Y.: Control of *Varroa jacobsoni* and *Tropilaelaps clareae* mites using Mavrik in *A. mellifera* colonies under subtropical and tropical climates. *American Bee Journal* 1988, 128 (1), 48-52

Lupo, A., Gerling, D.: A comparison between the efficiency of summer treatments using formic acid and Taktic against *Varroa jacobsoni* in beehives. *Apidologie* 1990, 21 (3), 261-267

Marchetti, S., Barbattini, R.: Comparative effectiveness of treatments used to control

*Varroa jacobsoni* Oud. Apidologie 1984, 15 (4), 363-377

Mattila, H., Otis, G.: The efficacy of Apiguard against varroa and tracheal mites, and its effect on honey production: 1999 trial. American Bee Journal 2000/1, 140 (12), 969-973

Mattila, H., Otis, G.: Trials of Apiguard, a thymol-based miticide, Part 2. non-target effects on honey bees. American Bee Journal 2000/2, 140 (1), 68-70

Mattila, H. R., Otis, G. W.: Trials of Apiguard, a thymol-based miticide. 1. Efficacy for control of parasitic mites and residues in honey. American Bee Journal 1999, 139 (12), 947-952

Melathopoulos, A., Winston, M., Whittington, R., Higo, H.: Field evaluation of neem and canola oil for the selective control of the honey bee mite parasites *Varroa jacobsoni* and *Acarapis woodi*. Journal of Economic Entomology 2000, 93 (3), 559-567

The Merck Index, Twelfth Edition 1996

Merrington, O.: Bibliography on the Use of Amitraz for Varroa Control in Bees (*Apis* spp.) (1979-1989). Cambridge, UK, Cambridge Animal and Public Health Ltd. 1990

Milani, N.: The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud to pyrethroids: a laboratory assay. Apidologie 1995, 26, 415-429

Milani, N.: The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to acaricides. Apidologie 1999, 30 (2-3), 229-234

Miozes-Koch, R., Slabezki, Y., Efrat, H., Kalev, H., Kamer, Y.: First detection of fluvalinate resistance in varroa mite use bioassay and biochemical methods. Experimental and Applied Acarology 2000, 24 (1), 35-43

Moretto, G., Guerra, J.C., Bittencourt, C.V.: Uncapping activity of *Apis mellifera* L. towards worker brood cells infested with the mite *V. destructor* Anderson et Trueman. Neotropical Entomology, 2006, 35, 299-301

Moosbeckhofer, R.: Apistan and Bayvarol - long-term effect of treated combs. Bienenvater 1991, 112 (3), 90-92

Moosbeckhofer, R.: Test with "Api-Life-VAR" for treatment of the varroa mite. Bienenwelt 1993, 35 (7), 161-166

Moosbeckhofer, R., Trouiller, J.: Apistan-resistant varroa mites found in Austria. Bienenvater 1996, 117 (10), 372-373

Nanetti, A.: Oxalic acid for mite control - results and review. Coordination in Europe of research on integrated control of Varroa mites in honey bee colonies, Merelbeke, Belgium, Commission of the European Communities 1999, 6-11



Peng, P.Y., Zhou, X., Kaya, H.K.: Virulence and site of infection of the fungus *Hirsutella thompsonii* to the honey bee ectoparasitic mite *V. destructor*. J. Invertebral Pathology 2002, 81 (3), 185-195

Ritter, W.: Varroaosis in the honey bee, *Apis mellifera*, and its control with Perizin [kumafos]. Veterinary Medical Review 1986, 1, 3-16

Ritter, W., Rath, H.: Experiments with mite resistance to varroacidal substances in the laboratory. European Research on Varroaosis Control, Proc. Meet. EC Experts' Group, Bad Homburg, Germany, Balkema, Rotterdam, 1988, 157-160

Ritter, W., Ruttner, F.: New methods for the treatment of varroa disease. Formic acid - laboratory and field test. Allgemeine Deutsche Imkerzeitung 1980, 14 (5), 151-153

Ruijter, A., Eijnde, J.: Field experiment to determine the efficacy of Bayvarol strips on Varroa mites in bee colonies and to determine the effect of the medicament on colony development in the months following application. Veterinary Medical Review 1991, 61, 30-35

Sanford, M.T., Denmark, H.A.: Varroa mite. [http://creatures.ifas.ufl.edu/misc/bees/varroa\\_mite.htm](http://creatures.ifas.ufl.edu/misc/bees/varroa_mite.htm) 2007

Santas, L.: Different tests with Folbex-VA against the Varroa disease during winter in Greece. Proceedings of the XXXIst International Congress of Apiculture 1989, 312-316

Samšičák, K. Harragsim, O.: Roztoč *Varroa jacobsoni* importován do Evropy. Včelařství 1972, 25, 268-269

Shen, M., Yang, X.: The role of varroa mites in infections of Kashmir bee virus (KBV) and deformed wing virus (DWV) in honey bees. Virology 2005, 10, 342 (1), 141-9

Schuster, H.: Comparison of different methods for varroa treatment with formic acid. Imkerfreund 1997, 52 (7), 4-12

Stoya, W., Wachendorfer, G.: Formic acid as a therapeutic agent in varroa disease and its levels in honey. Deutsche Lebensmittel Rundschau 1986, 82 (7), 217-221

Stoya, W., Wachendorfer, G.: Lactic acid as treatment against varroaosis and its effect on honey. Deutsche Lebensmittel Rundschau 1987, 83 (9), 283-286

Texl, P., Přidal, A.: Principy monitoringu spadu kleštika včelího (*V. destructor*). Moderní včelař 2008, 1, 15-16

Túri, M.S., Mátray, E.S.: Determination of acrinathrin residues in honey and beeswax. Acta Vet Hung 1999, 47 (2), 173-9

Van Engelsdorp, D., Underwood, R.M., Cox-Foster, D.L.: Short-term fumigation of honeybee colonies with formic and acetic acids for the control of *V. destructor*. *Journal of Economic Entomology* 2008, 101 (2), 256-64

Vesely, V., Machova, M.: Reduction of fluvalinate residues in beeswax by chemical means. *Journal of Apicultural Research* 1994, 33 (3), 185-187

Wachendorfer, G., Stoya, W.: Recent advances in the chemotherapy of *Varroa jacobsoni* infestation in bees. *Kongress der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft*, 1985, 346-358

Wahida, L-F., Nadia Aribi, Noureddine, S.: Evaluation of secondary effects of some acaricides on *Apis mellifera Intermissa*: Acetylcholinesterase and glutathione S – transferase activities. *European Journal of Scientific Research* 2008, 21 (4), 642-649

Wallner, K.: The use of varroacides and their influence on the quality of bee products. *American Bee Journal* 1995, 135 (12), 817-821

Wallner, K.: Varroacides and their residues in bee products. *Apidologie* 1999, 30 (2-3), 235- 248

Webster, T.C.: Live *Varroa jacobsoni* fallen from honey bee colonies. *Journal of Economic Entomology* 2000, 93, 1596 - 601.

Wilson, W. T., Collins, A. M.: Failure of formic acid to control *Varroa jacobsoni* in a hot climate. *American Bee Journal* 1993, 133 (12), 871

Woo, K. S., Cho, K. S. Dong, K.: Control effects of Apitol against *Varroa jacobsoni* Oud. in Korea. *Korean Journal of Apiculture* 1993, 8 (1), 48-55

Young, J.: *Varroa Mites*. Oregon State University Insect ID Clinic, [www.science.oregonstate.edu/bpp/insect\\_clinic/pests/varroa\\_mites](http://www.science.oregonstate.edu/bpp/insect_clinic/pests/varroa_mites) 2007



