

Výzkumný ústav včelařský, s.r.o.

Dol 94, 252 66 Máslovice

web: beedol.cz e-mail: beedol@beedol.cz

Závěrečná zpráva za rok 2024

o plnění úkolů vyplývajících ze Smlouvy o dílo DMS:

1118–2024–16232

uzavřené mezi MZe ČR a VÚVČ v Dole k problematice

„Molekulárně biologické metody

v prevenci a snižování ztrát včelstev_2024“.



Dol, listopad 2024

Objednavatel:

Česká republika – Ministerstvo zemědělství ČR
Těšnov 17, 117 05 Praha 1

Zastoupený: Ing. Martinem Žižkou, PhD.
ředitelem Odboru státní správy lesů, myslivosti
a rybářství

Pověřený zaměstnanec
pro technické jednání: Ing. Petr Krejčík

Zhotovitel: Výzkumný ústav včelařský, s.r.o.
Dol 94, 252 66 Máslovice

Zastoupený: Ing. Ondřejem Procházkou, ředitelem ústavu

IČO: 62968335

Pověřený pracovník:
Zprávu vypracovali: Ing. Dalibor Titěra, CSc.
RNDr. František Kašpar
Mgr. Veronika Jeřábková
Ing. Jan Machovec
Ing. Vojtěch Purnoch
MVDr. Martin Kamler
Ing. Dalibor Titěra, CSc.

V Dole 22. 11. 2024

Ing. Dalibor Titěra, CSc.
vedoucí výzkumu

Ing. Ondřej Procházka
ředitel ústavu

Obsah

I.	Úvod do problematiky	4
II.	Molekulárně biologické metody v prevenci ztrát včelstev	5
III.	Teoretické aspekty rezistence roztočů	9
IV.	Techniky navržené k detekci mutací	17
V.	Výsledky analýzy mutací	21
VI.	Porovnání výsledků z let 2023 - 2024	27
VII.	Diskuse	28
VIII.	Doporučení pro chovatele a pro veterinární dohled	30
IX.	Metodika správné chovatelské praxe	31
X.	Použitá literatura	32

I. Úvod do problematiky

Varroáza spolu s přidruženými virózy je bezpochyby hlavní příčinou potíží ve včelařství. Jelikož je varroáza od roku 1985 tlumena chemicky s využitím omezeného počtu účinných látek, není vznik rezistence roztočů vůči některým používaným akaricidům překvapivý.

Klíčovým opatřením proti vzniku rezistence roztočů v České republice zůstává přerušení jejich generačního cyklu během zimy prostřednictvím vhodně zvolených účinných látek. V praxi však často převažuje opakované používání osvědčených přípravků s jednoduchou aplikací. Ačkoli příbalové informace veterinárních přípravků i odborné články upozorňují na riziko vzniku rezistence, někteří chovatelé tento problém podceňují a vystavují včelstva riziku poškození kvůli nedostatečné účinnosti léčby.

Proto je nezbytné otázku rezistence řešit, a to mimo jiné pomocí dostupných a jednoduchých testů, které umožní chovateli takovou volbu ošetření proti varroáze, která bude účinná. Snížená účinnost léčiv nesmí vést ke zvyšování počtu ošetření a aplikované dávky. To by mohlo vést k vedlejším účinkům a vyššímu riziku reziduí.

Výskyt rezistentních mutací v populaci roztočů je dynamický jev, a proto je třeba testy opakovat zhruba v ročních intervalech. Aby bylo dosaženo co nejlepších

výsledků léčby, je třeba použít kombinace dostupných metod. Současně je nutné pokračovat ve vývoji a validaci testů v laboratorních i terénních podmínkách.

Soustředění úsilí a výzkumných kapacit na varroázu nesmí ale znamenat odsunutí dalších hrozeb na vedlejší koleje. V evropském i celosvětovém měřítku vydíme, že roste riziko škod na včelstvech v důsledku bakteriálních chorob (moru a hniloby), parazitů a predátorů.

Předmětem smlouvy 1118–2024–16232 uzavřené mezi MZe ČR a VÚVČ v Dole k problematice „Molekulárně biologické metody v prevenci a snižování ztrát včelstev“ jsou aktivity metodicky navazující na předchozí rok. Předmětem díla bude rozšíření literárního přehledu s důrazem na aktuální vědecké práce a pokračování praktického výzkumu zaměřeného na problematiku účinnosti léčiv po opakované aplikaci léčiv vůči rezistentním populacím a mutací populací kleštíka včelího na nových i stávajících experimentálních lokalitách. Důraz bude kladen zejména na sledování týkající se rezistencí parazitického roztoče *Varroa* na účinné látky ze skupiny pyrethroidů v porovnání s kontrolními registrovanými přípravky a postupy.

II. Molekulárně biologické metody v prevenci a snižování ztrát včelstev

Populace včely medonosné jsou celosvětově ohrožovány mnoha patogeny, které v různé míře přispívají k oslabení až kolapsům včelstev. Vedle parazitárních nákaz (*Varroa destructor*, *Nosema* sp. aj.) jsou významnými původci onemocnění zejména viry a bakterie. Počty ztrát včelstev v ČR i ve světě každoročně monitoruje projekt COLOSS (obr. 1).

Včelí viry se mohou množit v tělech dospělých včel i plodu. Přítomnost viru v jednotlivých včelách i ve včelstvu se nemusí navenek nijak projevit. Za určitých podmínek se ale nákaza viry může negativně projevit viditelnými klinickými příznaky a může včelstva oslabit až zlikvidovat. Viry jsou také schopny vyvolat u nakažených jedinců změny v chování, které jsou škodlivé pro ně samotné (např. ztráta orientace) nebo i pro celé včelstvo (změny v péči o plod, vliv na dlouhověkost apod.). Doposud bylo popsáno na dvě desítky včelích virů. Mezi nejvýznamnější z hlediska negativního vlivu na zdraví včel patří viry DWV (virus deformovaných křídel), CBPV (virus

chronické paralýzy), ABPV (virus akutní paralýzy), SBV (virová nákaza včelího plodu) a BQCV (virus černání matečnicků). Vertikálně se virové nákazy mohou přenášet z matky na potomstvo prostřednictvím vajíček (Prodělalová, Titěra 2018). V případě horizontálního přenosu se mohou včely nakazit přímým kontaktem mezi sebou, při péči o plod nebo z kontaminované potravy a prostředí. Roztoč *Varroa* figuruje jako vektor některých těchto virů (např. DWV; Genersch *et al.* Aubert, 2010; Sammataro *et al.* Yoder, 2011) a významně tak přispívá k šíření nákazy po okolí. Tlumení a monitoring populace kleštika včelího je prokazatelně účinnou strategií při boji s viry, které tento roztoč přenáší. Diagnostika virových nákaz včel je založená především na posouzení klinických příznaků ve včelstvu s ohledem na komplexní anamnézu (Prodělalová, Titěra 2018). V současnosti moderní molekulárně-genetické metody umožňují detekci virové RNA (ribonukleová kyselina) ze vzorků včel, včelích larev, vajíček, výkalů, medu nebo pylu (Čukanová *et al.* 2023; Prodělalová *et al.* 2017; Prodělalová *et al.* 2019). Tyto výsledky lze využít například při distribuci tzv. virů prostých matek či oddělků, což opět vede k zamezení šíření infekce (Prodělalová *et al.* 2017; Prodělalová, Titěra 2018).

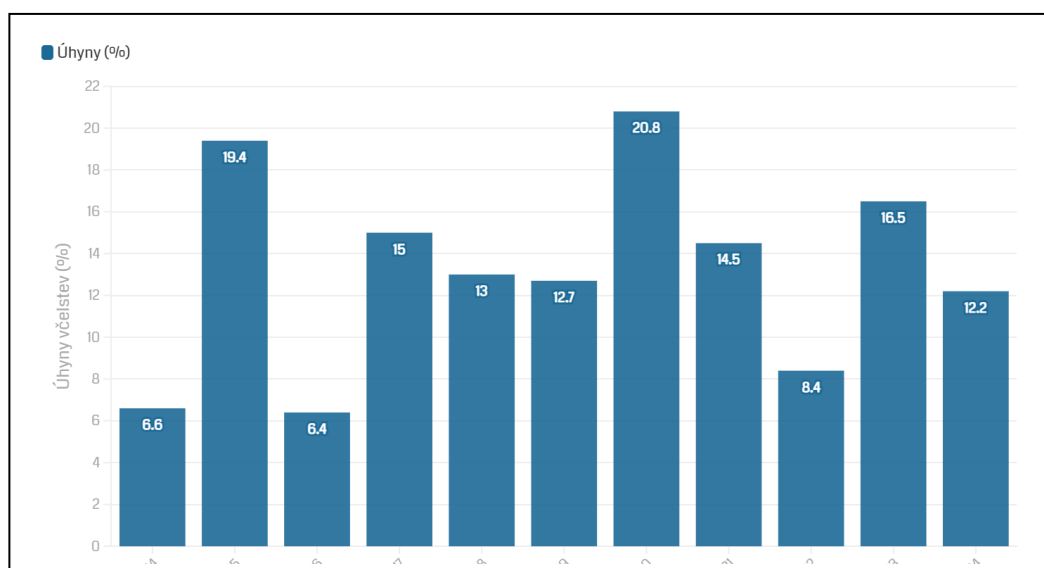
Patogeny, napadající včelstva včely medonosné, které nelze opominout, jsou bakteriální původci – *Paenibacillus larvae* způsobující mor včelího plodu a *Melisococcus plutonius* způsobující hnilobu včelího plodu. Obě tyto nebezpečné nákazy podléhající hlášení dle veterinárního zákona (zákon č. 166/1999 Sb) jsou na našem území rozšířené. Mor včelího plodu je zejména v některých krajích dlouhodobým problémem, hniloba je na vzestupu v poslední dekádě (obr. 2, 3; svscr.cz). Zatímco zlatým standardem při preklinické diagnostice *P. larvae* je kultivace infekčního agens ze včel, měli, medných zásob i jiného úlového materiálu, fyziologické vlastnosti bakterie *Melisococcus plutonius* komplikují její jednoduchou detekci v laboratoři. Z tohoto důvodu je zájem výzkumných projektů vyvinout metody, které by včasnou diagnostiku a preklinický screening hniloby včelího plodu umožnili. V posledních letech byly optimalizovány postupy detekce původce hniloby ze včelích dělnic (Hubert *et al.* 2020) i měli (Biová *et al.* 2021b) i metody identifikace bakteriálních izolátů (Jeřábková *et al.* 2019).

Molekulární metody mají využití také v diagnostice moru včelího plodu. Trendem posledních dekád je celogenomové sekvenování a podobné metody umožňující přesnou identifikaci bakteriálních izolátů (zejména genotypy ERIC I a II, Biová *et al.* 2021a; obr. 4) a mapování rozšíření jednotlivých sekvenčních typů *P.*

larvae v testovaných lokalitách (Binney *et al.* 2023). Tyto výsledky mají za cíl porozumět šíření infekčního materiálu mezi včelnicemi.

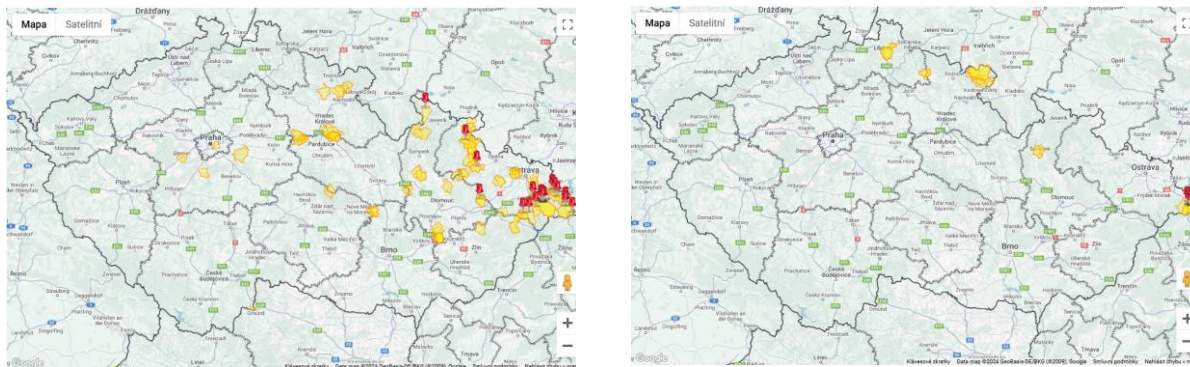
Správná včelařská praxe by měla zahrnovat efektivní monitoring a tlumení včelích nákaz, ať už se jedná o léčení za účelem snížení populace roztoče *Varroa* a omezení šíření včelích virů nebo včasné odhalení bakteriálních infekcí ve včelstvech. K tomuto účelu je nezbytná kombinace efektivních diagnostických metod, adekvátní použití léčiv a dezinfekčních přípravků ve včelařském provozu, v neposlední řadě je nezbytným předpokladem informovanost chovatelů a chov silných včelstev s přístupem ke kvalitní a druhově rozmanité včelí pastvě.

Obr. 1 – Meziroční srovnání úhynů včelstev a úspěšnosti zimování v ČR v letech 2013 – 2024. Data jsou každoročně získávána z vyplněných dotazníků od anonymně zapojených chovatelů v projektu COLOSS. Zdroj: collos.webnode.cz

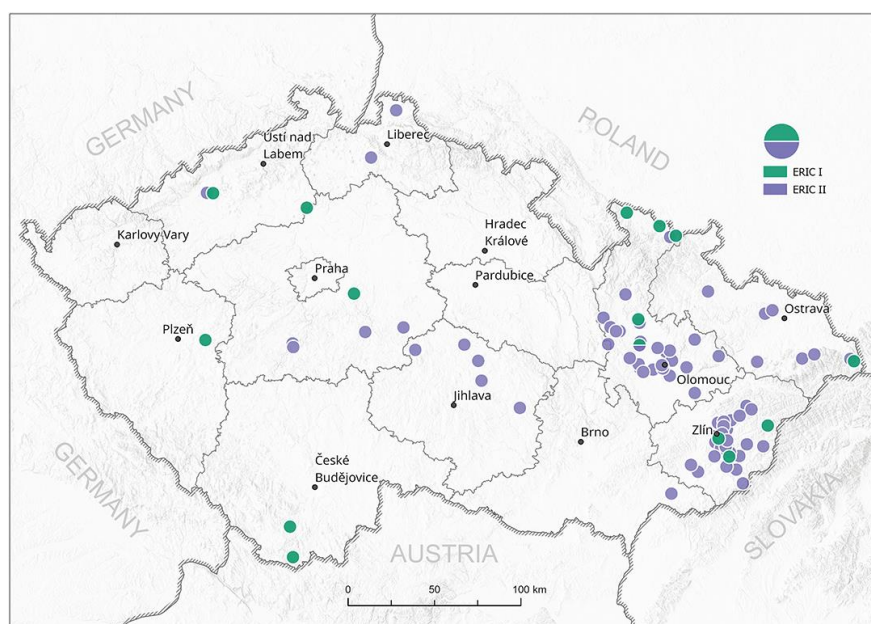


Obr. 2 (vlevo) Ohniska nákaz včel a ochranných pásem – ochranná pásma (žlutá) a ohniska (červená) moru včelího plodu k 21. 11. 2024. Zdroj: svscr.cz

Obr. 3 (vpravo) Ohniska nákaz včel a ochranných pásem – ochranná pásma (žlutá) a ohniska (červená) hniloby včelího plodu k 21. 11. 2024. Zdroj: svscr.cz



Obr.4 Rozšíření genotypů *P. larvae* ERIC I –(zelená) a ERIC II (fialová) v České republice v letech 2016 a 2017. (Zdroj: Biová, Bzdil a kol. 2021.)



III. Teoretické aspekty rezistence roztočů *Varroa destructor* k pyrethroidům

3.1 Kleštík včelí a jeho zařazení do systému

Kleštík včelí (*Varroa destructor*) (Anderson *et* Trueman, 2000) je ektoparazitický roztoč napadající včelu medonosnou (*Apis mellifera*). Ke svému rozmnožování využívá

plodové buňky plástů, ve kterých se vyvíjejí nedospělé včely. Výzkum posledních let ukázal, že jako potravu využívají místo hemolymfy tukovou tkáň hostitele (Ramsey *et al.*, 2016). Na území dnešní České republiky (tehdejšího Československa) byl kleštík včelí poprvé zachycen v roce 1978 (Čermák *et al.*, 2016).

V rámci systematického zařazení náleží kleštík včelí do třídy pavoukovci (Arachnida), řádu roztoči (Acari) a skupiny parazitických roztočů v rámci čeledi kleštíkovití (Varroidae) (Anderson *et al.*, 2000).

Kleštík včelí způsobuje u včel onemocnění varroózu (kleštíkovitost), během které poškozuje kutikulu hostitele a živí se tukovou tkání napadených jedinců. Při rozsáhlejším napadení dochází ke značnému snížení fitness celého včelstva (Rosenkranz *et al.*, 2010; van Dooremalen *et al.*, 2013). Včelstva hynou v průběhu 2–3 let po prvotní infestaci, pokud nedojde k včasnému léčebnému zásahu (Fries *et al.*, 2006). Kleštík je mimo jiné přenašečem řady bakteriálních (Hubert *et al.*, 2015) a virových onemocnění včel (Genersch *et al.*, 2010; Münstedt *et al.*, 2014; Wilfert *et al.*, 2016). Funguje jako přímý vektor při přenosu onemocnění akutní paralýzy včel (ABPV), kašmírského včelího viru (KBV), izraelského viru akutní paralýzy včel (IAPV) a viru deformovaných křídel (DWV) (Genersch *et al.*, 2010; Sammataro *et al.*, 2011).

3.2 Struktura genomu kleštíka včelího

K oddělení vývojové větve, do které spadá kleštík včelí, od vývojové větve nejbližší příbuzných klíšťat, došlo před 336 ± 26 miliony lety (Jeyaparakash *et al.*, 2009). V porovnání s genomy ostatních roztočů a zmíněných klíšťat je genom kleštíka velice malý ani ne poloviční. Dosahuje celkové velikosti 565 ± 3 Mbp.

Při studiu míry exprese genů byly odhaleny rozdíly mezi jedinci parazitujícími na původním hostiteli včele východní (*Apis cerana*) a mezi jedinci parazitujícími na evropské včele medonosné (*Apis mellifera*). Rozdíly v míře exprese byly detekovány u genů asociovaných s mitochondriální respirací, apoptózou, u genů regulujících reprodukci a oogenezi (Gladys *et al.*, 2016). Jelikož se kleštík včelí dostal na území Evropy až v průběhu posledních přibližně 60 let, není jeho adaptace na nového hostitele zcela dokonalá a do jisté míry mu způsobuje stres. Tomu nasvědčuje i zvýšená exprese nově demetylovaných genů řídících mitochondriální respiraci a apoptózu (Gladys *et al.*, 2016). Nicméně i přes tato fakta je adaptace a evoluce populací kleštíka značně dynamická a efektivní, což potvrzuje rychle se šířící rezistence roztoče k varroacidům a

jeho vysoce adaptivní koevoluce s viry způsobujícími onemocnění včel, a to jak na území Evropy, tak i mimo ni (Mondet *et al.*, 2014; Gladys *et al.*, 2016).

I přes sourozenecké páření, samce s haploidním genotypem a značně působící efekt hrdla lahve není u kleštíka redukován genetický polymorfismus. Obecně se rozlišují dva základní haplotypy – haplotyp J (*Japanese*) parazitující na včele medonosné v Japonsku, Americe a na Thaiwanu, a haplotyp K (*Korean*), který je rozšířený celosvětově (Anderson *et al.*, 2000). Později byl popsán další sub-haplotyp v rámci haplotypu K (Navajas *et al.*, 2010; Gajić *et al.*, 2013) a heteroplazmická linie kleštíka včelího (Gajić *et al.*, 2016). Variabilitu na úrovni genů lze u kleštíka najít mezi populacemi jednotlivých úlů, kolonií, i v rámci větších geografických celků (Dynes *et al.*, 2016). K míšení populací kleštíků dochází přirozenou cestou prostřednictvím jejich přenosu na včelách zalétávajících do cizích úlů. Stále častěji jsou však včelstva uměle přesouvána z důvodu jejich umístění do oblastí bohatějších na potravu, případně jsou stěhována v důsledku obchodu se včelstvy, což umožňuje rychlejší a rozsáhlejší míšení geneticky diverzifikovaných populací kleštíků (Cornman *et al.*, 2010).

K analýze populační variability kleštíků je využíváno 10 neutrálních polymorfních mikrosatelitových lokusů z celkového počtu dvou desítek identifikovaných mikrosatelitových lokusů. Jedná se o lokusy vj272, vj292, vj294, vj295 (Evans, 2000), a lokusy VD001, VD112, VD114, VD119, VD126, VD163 (Salignac *et al.*, 2003). Analýzou těchto 10 lokusů bylo identifikováno 42 polymorfních alel, které se vyskytují v počtu 2 až 13 alel na jeden lokus (Dynes *et al.*, 2016). Autoři studie uvádějí pro těchto 10 lokusů celkovou hodnotu heterozygotnosti jako 0,09, typickou pro populace s vysokým procentem inbredního křížení, což odpovídá rozmnožovací situaci popsané u kleštíka (Dynes *et al.*, 2016).

3.3 Rozmnožování kleštíka včelího

Rozmnožovací strategií kleštíka včelího je pseudo-arrhenotokie (De Jong *et al.*, 1982; Martin *et al.*, 1997). Spárené matky kladou vajíčka s diploidní sadou chromozomů ($2n = 14$), ze kterých se vyvíjejí samice, a haploidní vajíčka ($n = 7$), ze kterých se líhnou samci (Steiner *et al.*, 1982; De Ruijter *et al.*, 1983; Martin *et al.*,

1997). Ve vajíčkách, ze kterých se vyvíjejí samci, dochází krátce po splynutí pohlavních buněk k eliminaci paternální sady chromozomů (Sabelis *et* Nagelkerke, 1992; De La Filia *et al.*, 2015).

Oplozené samice kladou vajíčka do buněk včelího plodu před jeho zavíčováním. Při dostatečném počtu zakladených plodových buněk lze najít v každé napadené buňce zpravidla jednu dospělou samici kleštíka (Fuchs *et* Langenbach, 1989). S desetinásobně vyšší frekvencí si samice kleštíka vybírají k napadení buňky larev déle se vyvíjejícího trubčího plodu (24 dní), dělníci plod se vyvíjí pouze 21 dní (Martin *et* Cook, 1996). Vyšší efektivita rozmnožování je dále dosaženo naklazením pouze jednoho vajíčka, ze kterého se vyvíjí samec, z dalších 4–5 nakladených vajíček se vyvíjejí samice (De Ruijter *et* Pappas, 1983; Rehm *et* Ritter, 1989; Brown *et al.*, 2015). Embryonální vývoj roztoče začíná již ve vajíčku v těle matky (Ionescu-Varo *et* Suciu, 1979; Rehm *et* Ritter, 1989), po naklazení vajíček jsou embrya multiceulární, v pokročilém stádiu diferenciaci (Rehm *et* Ritter, 1989). Vývoj kleštíka od nakladeného vajíčka po dosažení dospělosti trvá 6,2 dne u samice a 6,9 dne u samce. Po dovršení pohlavní dospělosti dochází ke spáření nově vylíhlé generace kleštíků v rámci jedné plodové buňky včel (sourozenské páření) (Hamilton, 1967; Pohl, 2008). Spárené samice kleštíka unikají z plodové buňky po jejím otevření přichycené na líhnoucí se včele, samci v buňce hynou (Martin, 1994). I při vysoké úrovni inbreedingu nedochází u kleštíků k inbrední depresi (Beaurepaire *et al.*, 2015; Dynes *et al.*, 2016). Heterozygotnost populace v úlu se zachovává především díky přenosu jedinců přichycených na včelách zalétlých ze sousedních včelstev (Frey *et* Rosenkranz, 2014; Forfert *et al.*, 2015), a dále díky nesourozenskému páření kleštíků v plodových buňkách napadených více samicemi – matkami. Na konci vegetačního období totiž dochází ke snížení poměru počtu zakladených plodových buněk k počtu kleštíků, kteří je napadají, a tak musí být jedna plodová buňka napadena větším počtem dospělých samic (Beaurepaire *et al.*, 2017).

3.4 Chemické varroacidní přípravky

Kontrola a redukce počtu kleštíků v napadeném včelstvu je nejčastěji prováděna za použití chemických látek s varroacidním účinkem (Watkins, 2011). Do nepočetné skupiny používaných varroacidních látek náleží především pyrethroidy **tau-fluvalinát**, **flumethrin** a **acrinathrin**, a formamidinový derivát **amitraz** (Martin, 2004; Maggi

et al., 2011)

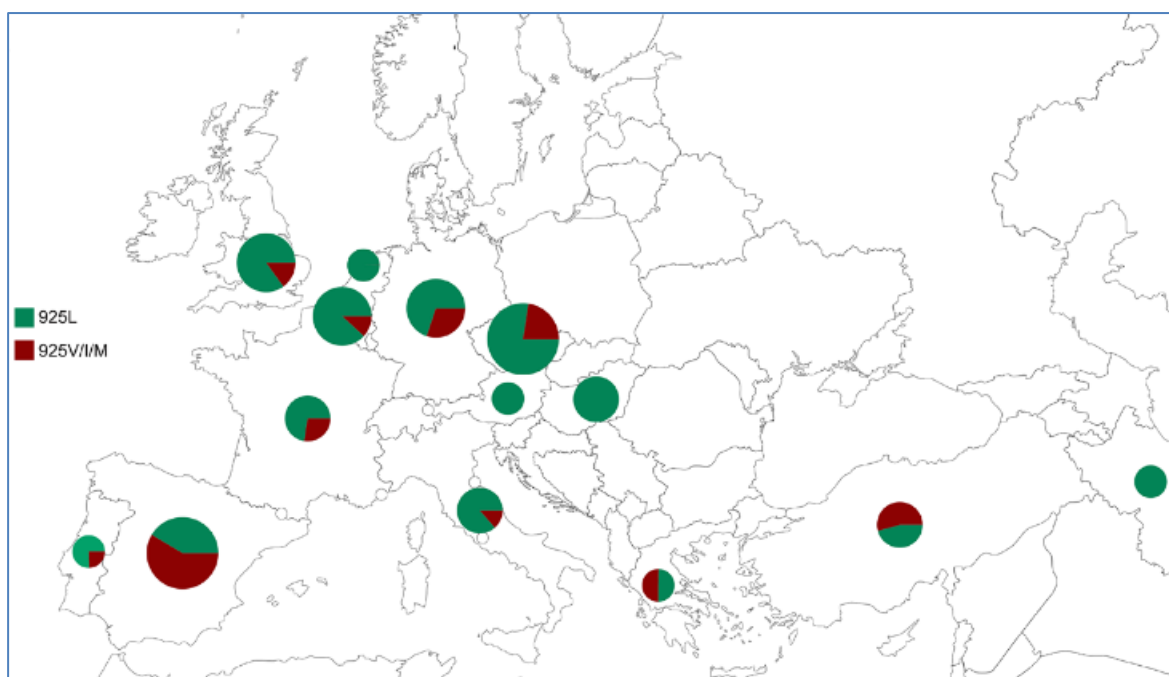
V průběhu posledních třiceti let účinnost varroacidních látek rapidně klesla v důsledku vyselektování početných rezistentních populací kleštíků, a to na území Evropy (Milani, 1995; Spreafico *et al.*, 2001; Thompson *et al.*, 2003), Severní Ameriky (Elzen *et al.*, 2000; Rodriguez-Dehaibes *et al.*, 2005), Jižní Ameriky (Maggi *et al.*, 2011) a jihozápadní Asie (Farjamfar *et al.*, 2018). V rámci skupiny pyrethroidních varroacidů tau-fluvalinátu, flumethrinu a acrinathrinu, které svým účinkem cílí na sodíkový kanál, byla prokázána křížová rezistence (Soderlund, 2008). Jedná se o typ rezistence vznikající u skupiny látek se stejným mechanismem účinku (blokace sodíkového kanálu). Na odlišném principu je založena takzvaná mnohonásobná rezistence mezi pyrethroidem tau-fluvalinátem či flumetrinem a derivátem formamidinu amitrazem, patřícími do různých strukturních skupin varroacidů, které se v buňce navazují na odlišná receptorová místa a mají různý mechanismus účinku. Amitraz na rozdíl od výše uvedených pyrethroidů cílí na oktopaminový receptor, jehož aktivitu blokuje (Elzen *et al.*, 2000; Casida *et al.*, 2013, Rinkewich *et al.*, 2023, Hernandez- Rodriguez *et al.*, 2022). Ke vzniku mnohonásobné rezistence dochází nejčastěji v důsledku vzniku mutací v genech pro detoxikační enzymy, přičemž dochází k zvýšení efektivity metabolizace strukturně odlišných látek (Sammataro *et al.*, 2005; Hubert *et al.*, 2017).

Rezistence k pyrethroidům je především dána mutantní alelou vyskytující se v DNA v homozygotní formě (Davies *et al.*, 2007). Bylo potvrzeno, že po aplikaci pyrethroidu dochází v populaci kleštíků k nárůstu počtu jedinců s homozygotním genotypem pro mutantní alelu udílející rezistenci. V nepřítomnosti varroacidu jsou pak rezistentní homozygotní jedinci rychle eliminováni ve prospěch vnímavých jedinců (homozygotních pro *wild-type* alelu nebo heterozygotních) (González-Cabrera *et al.*, 2013, 2016 a 2018). Rezistentní jedinci mají totiž v nepřítomnosti varroacidu významně nižší fitness, než jedinci vnímaví (Kliot *et al.*, 2012).

Podíl heterozygotních jedinců je obecně nízký, což je v korelaci se způsobem dědičnosti vlastností v rámci haplo-diploidního kódování pohlaví kleštíka, a také s dědičností a projevem *knockdown* a *super-knockdown resistance* mutací, které způsobují rezistenci kleštíka k varroacidům (Solignac *et al.*, 2005; Davies *et al.*, 2007).

Obr. 5 Rozšíření citlivých a rezistentních populací *Varroa destructor* v Evropě a na Blízkém východě. Zelená barva v kruhu představuje zastoupení citlivých populací roztoče k pyretroidům. Červenou barvou jsou znázorněny rezistentní homozygotní populace roztočů nesoucí mutaci L925/V/I/M v genu pro sodný kanál. Velikost kruhu představuje proporci počtu testovaných vzorků (nejmenší 1-200, 200-1000, 1000-2500 a největší kruh více než 2500).

Převzato z Erdem et al. 2024.



3.5 Molekulární aspekty rezistence kleštíka včelího k pyrethroidům

Sekvenace genomu modelového organismu pro studium roztočů svilušky chmelové (*Tetranychus urticae*) ukázala, že k akaricidové rezistenci dochází v důsledku diverzifikace a nárůstu počtu genů pro detoxikační enzymy, nebo kvůli necitlivosti vazebného místa enzymu či buněčného receptoru k vázající se molekule. Rezistence

roztočů pak může být zapříčiněna jak mutacemi v DNA jaderné, tak v DNA organelové (především mitochondriální), která vykazuje maternální dědičnost (Van Leeuwen *et al.*, 2008; Van Leeuwen *et Dermauw*, 2016).

Mutace v mitochondriálních genech ovlivňují diverzifikaci a funkční aktivitu detoxikačních enzymů. Jedná se především o geny pro cytochrom P450 monooxygenázy, karboxyl/cholinesterázy, glutathion-S-transferázy a ATP-vazebné kazetové transportéry (Smissaert, 1964; Grbić *et al.*, 2011; French-Constant, 2013; Feyereisen *et al.*, 2015). U kleštíků rezistentních k tau-fluvalinátu jsou detoxikační enzymy aktivnější, například monooxygenázy v rámci detoxikačního systému cytochromu P450 (Watkins, 1997).

Pravděpodobně nejvýznamnějším typem mutací navozujícím rezistenci roztočů k akaricidům jsou takzvané kdr nebo super-kdr mutace (knockdown resistance), které způsobují snížení citlivosti nervového systému k působící látce v důsledku přítomnosti bodových mutací v genech pro buněčné receptory (Wang *et al.*, 2002).

Mutace navozující rezistenci roztočů k syntetickým pyrethroidům jsou převážně druhově specifické. Substituce L925V v doméně DII smyčky L6 sodíkového kanálu VGSC je asociována s rezistencí kleštíka včelího k tau-fluvalinátu (González- Cabrera *et al.*, 2013; Hubert *et al.*, 2013). Na rezistenci kleštíků k pyrethroidům má mimo jiné také vliv množství přítomných povrchových kutikulárních proteinů a aktivita povrchových proteáz, které se podílejí na metabolizaci xenobiotik (Strachecka *et al.*, 2013)

3.6 Sodíkový kanál kleštíka včelího (VmNa)

Základní struktura a organizace VmNa kanálu (někdy také označení VdNa_v) je totožná se strukturou napětově řízených sodíkových kanálů členovců (Arthropoda) i savců (Mammalia).

Aminokyselinové složení vazebné domény VGSC roztočů a ostatních členovců se vzájemně liší. Tato vzájemná diferenciací umožňuje vývoj selektivních akaricidů působících pouze na ektoparazitické roztoče, bez destruktivního vlivu na hostitele, jako je tomu v případě varroacidů cílících na kleštíka včelího, parazita včely medonosné (O'Reilly *et al.*, 2014).

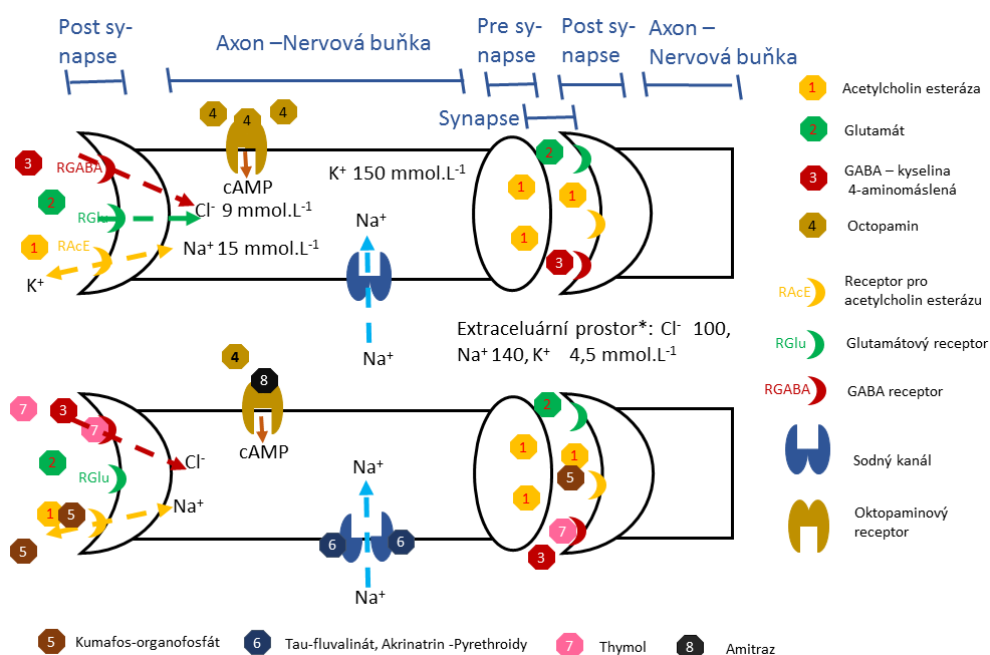
Pyrethroidní látky se váží na otevřený kanál, prodlužují jeho aktivaci a zabráňují inaktivaci. Dochází k narušení koncentračního gradientu sodných i jiných iontů následované zamezením přenosu vzruchů (Narahashi, 2000; Soderlund, 2012; Silver *et*

al., 2014; O’Leary *et al.*, 2018).

Doposud identifikované bodové mutace asociované s rezistencí kleštíka včelího k *tau*-fluvalinátu zapříčiňují aminokyselinovou substituci na pozici 925 vznikajícího polypeptidu (číslováno dle *Musca domestica* Vssc1 proteinu). Tato substituce je klíčová pro vznik rezistence kleštíka k syntetickým pyrethroidům (Wang *et al.*, 2002; González-Cabrera *et al.*, 2013). První identifikovanou aminokyselinovou substitucí způsobující rezistenci kleštíka k *tau*-fluvalinátu byla substituce L925V (González-Cabrera *et al.*, 2013). Později byly identifikovány také substituce aminokyselin L925M a L925I (González-Cabrera *et al.*, 2016).

Nová studie z Nového Zélandu se zaměřila na rezistenci varroa vůči amitrazu a flumethrinu kombinací lahvičkových testů a molekulárních metod. V roce 2022 lahvičkový test prokázal pro flumethrin LC50 156 µg (115-216 µg), kdežto v roce 2005 byla hodnota LC50 6 µg (3-17 µg). Koncentrace flumethrinu potřebná k usmrcení 50 % roztočů varroa se tedy 26násobně zvýšila během 17 let. Sami autoři však zmiňují, že v původní in vitro studii byla pozorována velká variabilita mortality roztočů ve všech testovaných skupinách a test mohl být ovlivněn rozdílnou teplotou vlhkostí. Molekulární detekce rezistence roztočů z roku 2022 však neprokázala výskyt mutací spojených s rezistencí roztočů vůči pyrethroidům. Varroa byla poprvé na území Nového Zélandu detekována v roce 2000 a v témže roce se ihned začala používat léčiva obsahující flumethrin. I v současnosti jsou zde léčiva s flumethrinem druhým nejčastěji používaným přípravkem k tlumení varroázy ve včelstvech. Praxe rotace léčiv k zamezení vzniku rezistence se opět ukazuje jako klíčová k zajištění účinnosti pyrethroidů k tlumení varroázy.

Obr. 6 Nervová buňka roztoče *Varroa destructor* jako cíl účinných látek léčiv k tlumení varroázy. Pyretroidy tau-fluvalinát, flumethrin, dříve i akrinathrin, se váží na sodný kanál a způsobují konformační změnu ovlivňující propustnost Na^+ iontů. Bodová mutace v sodném kanálu vede k tomu, že se pyretroidy nedokáží na receptor navázat a roztoči jsou vůči účinné látce v léčivu rezistentní. Thymol se váže na GABA receptor, který je za normálních podmínek modulován kyselinou gama-aminomáselnou. Thymol kompetuje s tímto neurotransmiterem. Amitraz se váže na oktopaminový receptor a mění produkci cAMP. Organofosfát kumafos inhibuje enzym acetylcholinestrázu (v ČR není léčivo registrované s touto účinnou látkou). Obrázek je převzat z Hubert a kol. (2017).



IV. Techniky navržené k detekci mutací způsobujících rezistenci kleštíka včelího k pyrethroidům

K detekci bodových mutací způsobujících rezistenci kleštíka včelího k pyrethroidům byla jako první používána tzv. lahvičková metoda (Milani, 2015). Stanovuje se při ní procentuální mortalita roztoče (LC_{50} , LC_{90} a LC_{95}) vůči definované koncentraci varroacidu. V principu se jedná o jednoduchý test, jeho nevýhodou však je nutnost pracovat s živým biologickým materiálem (kleštíky). Výsledky testu jsou navíc významně ovlivněny podmínkami experimentu (například teplotou a vlhkostí), přičemž lze těžko přiřadit informaci o molekulárním základu rezistence.

Pozici mutací způsobujících rezistenci k pyrethroidům lze určit sekvenací úseků zájmových genů. Při zjišťování rezistence kleštíka k *tau*-fluvalinátu a flumetrinu se sekvenace provádí na úseku genu pro sodíkový kanál (*VmNa*) obsahujícím nukleotidové pozice 1710 a 1712 (GenBank Accession no. KC152655.2) (Hubert *et al.*, 2013). Nevýhodou sekvenování je však značná cena experimentu (pro rutinní použití) a omezená dostupnost potřebného laboratorního vybavení (především sekvenátoru) v menších laboratořích.

Další diagnostická metoda využívá pro genotypizaci a určení konkrétní alelické varianty na nukleotidových pozicích 1710 a 1712 (aminokyselinové substituce L925V/M/I) fluorescenčně značené Taqman[®] próby (González-Cabrera *et al.*, 2016). Jedná se o specifickou multiplexní metodu umožňující diskriminaci až šesti různých alel v reakci. Nevýhodou je však vysoká cena analýzy a nutnost využívání speciálního přístrojového vybavení (real-time PCR termocyklér).

Další metoda PCR-RFLP využívá k určení přítomnosti mutace na nukleotidové pozici 1710 restrikční štěpení pomocí *SacI* restrikční endonukleázy (González-Cabrera *et al.*, 2018; Hubert *et al.*, 2018). Enzym štěpí motiv GAGCT/C mezi nukleotidovými pozicemi 1709 a 1710, a je tudíž schopný odlišit *wild-type* alelu mající na pozici 1710 cytosin od mutantních alel, u kterých je cytosin nahrazen guaninem nebo adeninem. Po namnožení úseku DNA obsahujícího pozici 1710 a přidání restrikčního enzymu do reakce jsou na výsledném elektroforetogramu viditelné dva štěpné produkty po rozštěpení původního PCR produktu *wild-type* alely (1710: C), nebo pouze jeden nerozštěpený produkt v případě detekce mutantní alely (1710: G/A). V případě

heterozygotního jedince pro rezistentní alelu jsou na elektroforetogramu viditelné tři produkty odpovídající nerozštěpenému původnímu PCR produktu a dvojici produktu štěpných. Výhodou této metody jsou především nízké nároky na laboratorní vybavení a možnost snadného rozlišení *wild-type* a rezistentních homozygotů, či heterozygotů. Není však možné určit, který nukleotid změněný mutací a způsobující rezistenci kleštíka k *tau*-fluvalinátu se na pozici 1710 nachází (Stará *et al.*, 2019).

Nejnovější 3-PAS-PCR diagnostická metoda (Lahnerová *et al.*, 2019) umožňuje detekci *wild-type* varianty DNA s nukleotidy cytosinem (C) na pozici 1710 a guaninem (G) na pozici 1712, dále pak detekci tří mutantních genotypů G(1710) + G(1712), A(1710) + G(1712) a A(1710) + A(1712), které způsobují rezistenci kleštíka včelího k *tau*-fluvalinátu i flumetrinu, a to jak u homozygotních tak heterozygotních jedinců. K diagnostické analýze slouží set dvou okrajových a čtyř specifických diagnostických primerů. Diagnostická tříprimerová metoda (3-PAS-PCR) využívá PCR amplifikaci templátové DNA pomocí tří primerů obsažených v jedné PCR reakční směsi. Jsou jimi dva okrajové primery amplifikující úsek *VmNa* genu obsahujícího nukleotidové pozice 1710 a 1712 postihované mutacemi, a jeden primer diagnostický, umožňující určení konkrétní mutační varianty těchto nukleotidových pozic. Pro určení absence či přítomnosti (a varianty) mutace je klíčový 3'-koncový nukleotid konkrétní varianty diagnostického primeru, který danou mutaci selektivně charakterizuje.

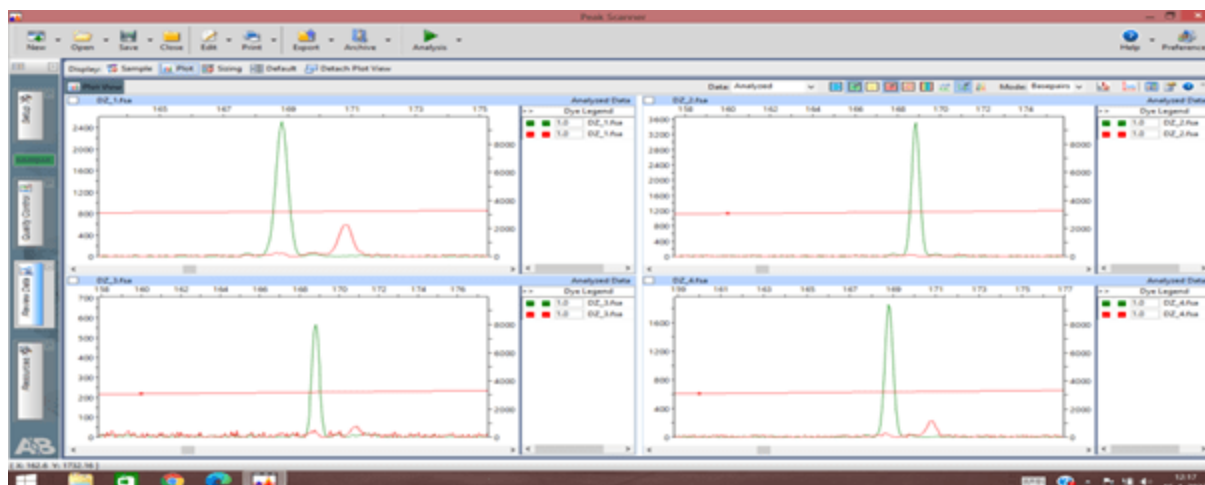
Variantou 3- PAS- PCR metody je využití fluorescenčně značených diagnostických primerů, což umožňuje multiplexní fragmentační analýzu s pomocí kapilární elektroforézy (Kašpar, F., 2021, nepublikováno). Výsledkem je preciznější a levnější analýza v jediné reakci.

Výsledky jsou graficky ztvárněny tak, aby byly interpretovatelné i pro zaškoleného neodborníka. Níže je uveden příklad tří modelových stanovišť včelstev s rozdílnou populací parazita.

Modelové stanoviště 1

4 vzorky po 10 roztočích – pouze zelený pík (nemutovaná varianta) = **citlivá populace**

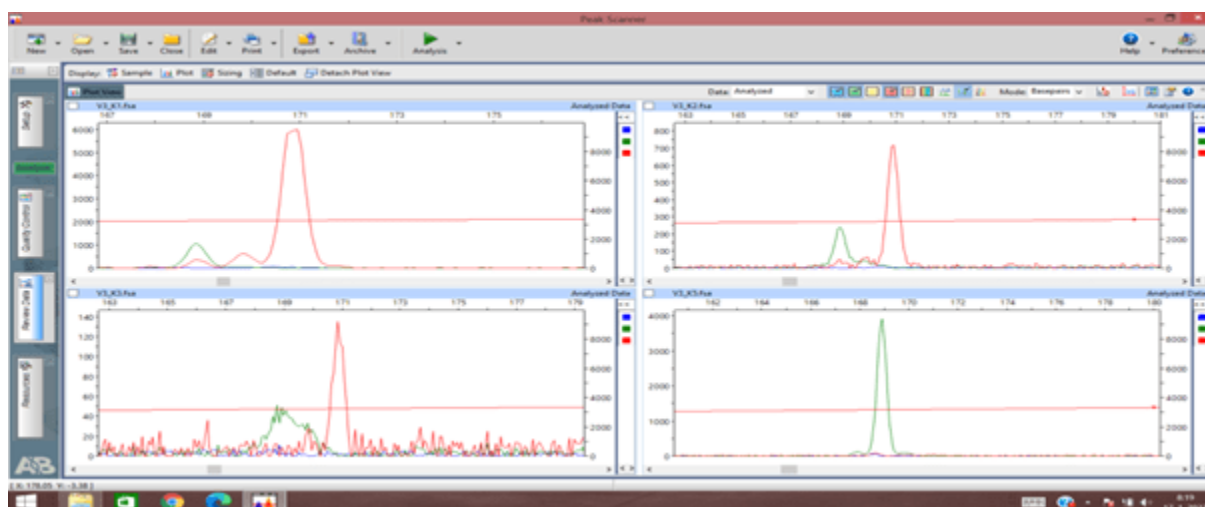
» DOPORUČUJE se nasazení pyrethroidů



Modelové stanoviště 2

4 vzorky po 10 roztočích – 3x červený pík (mutace), 1x zelený pík = **odolná populace**

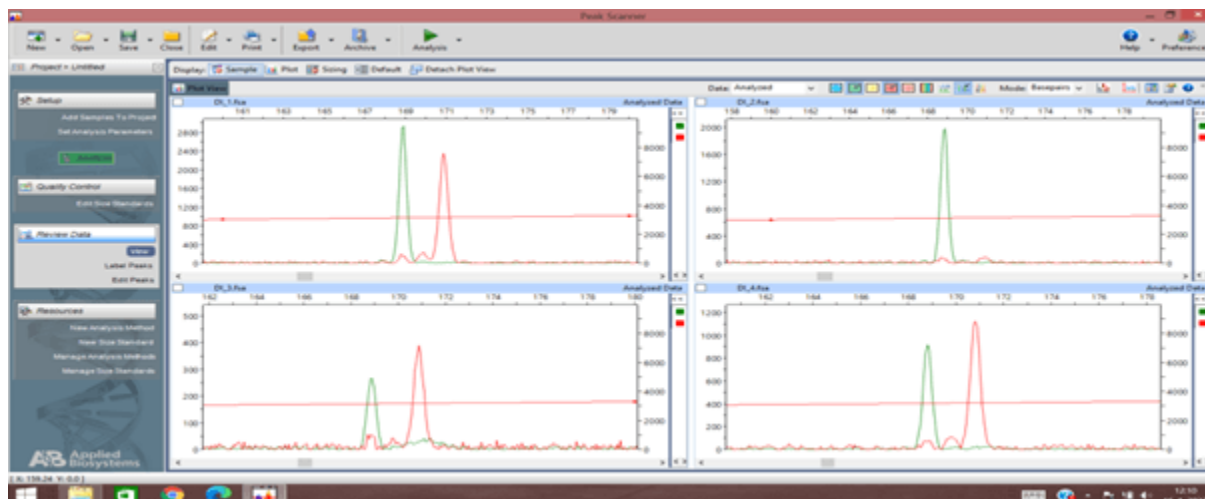
» NEDOPORUČUJE se nasazení pyrethroidů



Modelové stanoviště 3

4 vzorky po 10 roztočích – 1x zelený pík, 3x červený i zelený pík = **smíšená populace** s výskytem mutované varianty

» NEDOPORUČUJE se nasazení pyrethroidů



ometeme a soustředíme do jediného směsného vzorku. Není nutné roztoče z měli vybírat.

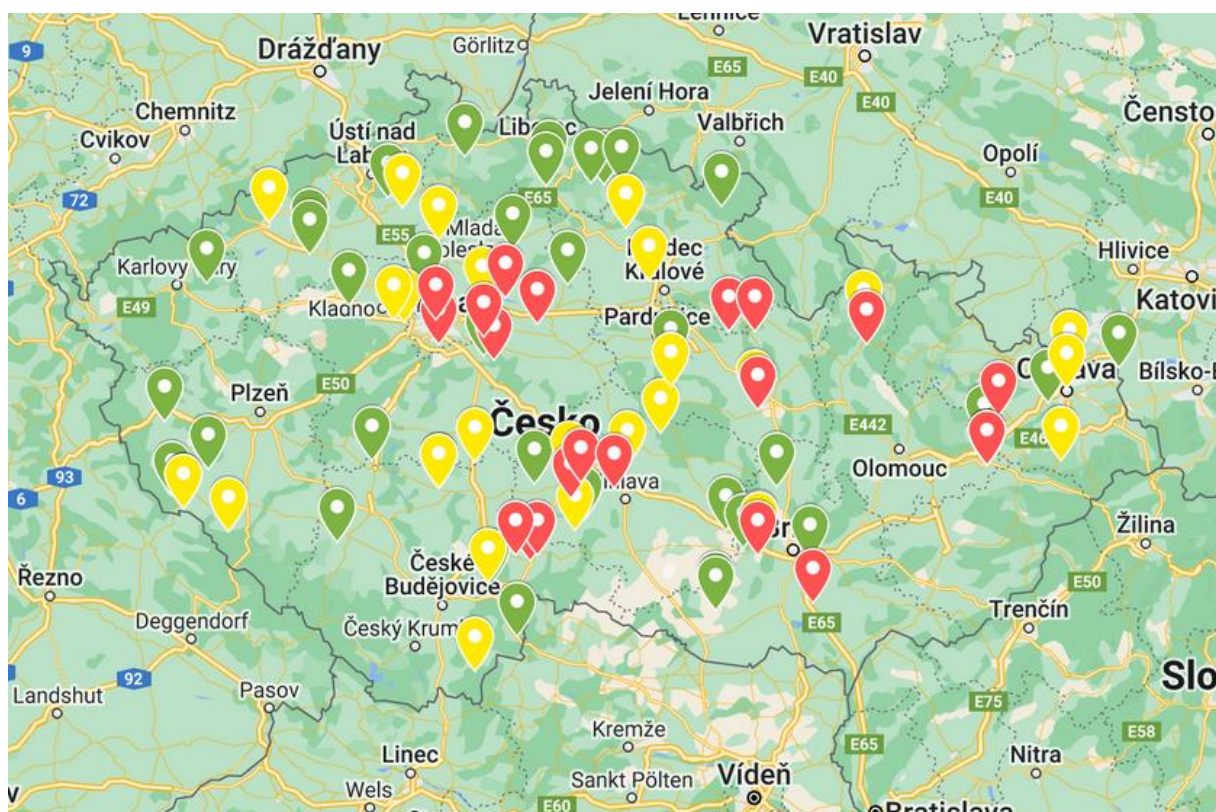
Minimální počet roztočů ve směsném vzorku je 50 ks. V případě menšího napadení lze odběr opakovat další ráno. Vzorky je třeba přechovávat při nízkých teplotách (chladnička, mraznička), aby se zpomalila degradace makromolekul.

5.3 Výsledky

Roztoče jsme sbírali v plánovaném rozsahu z lokalit zahrnujících celou Českou republiku a zaměřili jsme se na získání dalších spolupracovníků v dosud netestovaných lokalitách.

Materiál byl zpracován, analyzován na výskyt mutací, a lokality zařazeny do jedné ze tří kategorií. Získané výsledky jsou zasazeny do mapy (zelená = populace vnímavá, červená = populace rezistentní, žlutá = stav smíšené populace).

Mapa 2 - Výsledky roku 2024



Znázorněná data v mapách jsou čerpána z níže uvedené tabulky pro rok 2024

Tabulka 1 Lokality původu analyzovaných roztočů (2024)

Kód	Datum doručení	Počet včelstev	Registrační číslo stanoviště	Lokalita	Souřadnice stanoviště LPIS	Rezistence (%)
R24_74	19.09.24	3	90572856	Bor	49.70670843755595, 12.78660625398214	0
R24_12	06.09.24	6	90455216	Halámky	48.849094040562676, 14.9233700378278	0
R24_68	18.10.24	16	90704123	Havlíčkův Brod	49.156702990614285, 16.695678652528393	0
R24_65	16.10.24	6	90674691	Hlubočky	49.52999633450587, 17.763758125363815	0
R24_64	16.10.24	6	90674691	Hlubočky	49.53019666909029, 17.763814224617462	0
R24_8	17.09.24	8	90042982	Jilemnice	50.63101392818321, 15.551331561291963	0
R24_39	06.09.24	6	90272640	Klimkovice	49.77675142110375, 18.14172338762746	0
R24_104	03.09.24	12	90487907	Krásné	49.67820 , 15.58703	0
R24_31	01.10.24	6	90634978	Lomnice nad Lužnicí	49.05819981647949, 14.767620758502206	0
R24_76	21.10.24	10	90780419	Losinná u Plzně	50.37600327121019, 14.895637017565598	0
R24_54	03.09.24	10	90505087	Louny	50.351953832566736, 13.664199934391297	0
R24_20	03.09.24	10	89885705	Louny	50.39359625053285, 13.672199309378527	0
R24_21	04.09.24	24	90151770	Máslovice	50.22143902050502, 14.36155119040447	0
R24_14	25.09.24	6	89075076	Mírovce	49.544463398915305, 14.037393309408737	0
R24_82	30.10.24	3	90085631	Mnichovice	49.95873654042534, 14.722293229626821	0
R24_1	30.08.24	8	89912807	Nasavrky	49.92651320647196, 15.848002275104001	0
R24_11	12.09.24	5	90338597	Nové Strašecí	50.153354978343714, 13.902694957423854	0
R24_25	05.09.24	15	90766851	Opočnice	50.23559778975408, 15.22611299278751	0
R24_102	26.09.24	12		Orel	49.91679, 15.84591	0
R24_24	31.07.24	12	89747746	Pacov	49.45659704049158, 15.03300027789437	0
R24_37	27.09.24	6	90749436	Peřimov	50.61595271639544, 15.45080833324325	0
R24_9	10.09.24	6	90608799	Petrovice u Karviné	49.906723170561975, 18.567814377073493	0
R24_44	03.09.24	6	90287567	Plzeň	49.508352552273585, 13.051745438178695	0
R24_18	13.09.24	6	90388187	Příbram na Moravě	49.20145568490596, 16.290135478110027	0
R24_107	11.09.24	24	89637968	Příchovice	49.56046,	0
R24_108	10.10.24	16	89646159	Pusté Žbřidovice	50.09008, 17.00193	0

Kód	Datum doručení	Počet včelstev	Registrační číslo stanoviště	Lokalita	Souřadnice stanoviště LPIS	Rezistence (%)
R24_48	11.09.24	8	89324916	Rychnov u Jablonce	50.61220758118788, 15.096765019354903	0
R24_47	11.09.24	8	89938715	Rychnov u Jablonce	50.65832486283894, 15.120700847960213	0
R24_36	18.09.24	16	90767997	Říčany	49.21572019927888, 16.392459002819518	0
R24_41	26.09.24	8	89580819	Semily	50.62822764580076, 15.369196836549394	0
R24_17	26.09.24	5	90410914	Semnice	50.23902918996387, 13.03912461154123	0
R24_2	11.09.24	6	90407303	Stárkov	50.53109903618435, 16.16216497117564	0
R24_40	24.09.24	6	89645406	Svojkov	50.724392181650934, 14.60057822989708	0
R24_103	27.08.24	12		Švihov	49.48218, 13.28519	0
R24_101	24.09.24	12	90548062	Včelákov	49.81744, 15.88763	0
R24_105	26.09.24	16	89941337	Votice	49.63696, 14.64278	0
R24_106	11.09.24	24	89311934	Vranov nad Dyjí	48.89715, 15.81498	0
R24_23	25.09.24	15	90400036	Žeravice	49.63163351329518, 17.757797903010086	0
R24_46	26.09.24	9	90354371	Horní Cerekev	49.309698122093465, 15.322056165286067	6
R24_79	24.10.24	14	90616642	Křešice	50.568804556582876, 14.135474770139233	6
R24_26	12.09.24	6	90578515	Lysice	49.44885722980828, 16.485567990382386	6
R24_51	10.10.24	4	89268115	Strakonice	49.22556287116887, 13.836717049820654	6
R24_42	27.08.24	16	89052789	Trhanov	49.414106672350236, 12.830024450609976	6
R24_16	26.09.24	16	89970711	Velká Bíteš	49.2733284650836, 16.18279252289776	6
R24_78	27.08.24	10	90370986	Višňové	48.95853175193412, 16.126514420227586	6
R24_77	27.08.24	10	89425165	Višňové	48.97553208857731, 16.124492267617022	6
R24_69	09.10.24	6	89052857	Domažlice	49.35892349612157, 12.894670231737663	12
R24_69	09.10.24	6	89052857	Domažlice	49.35898726701644, 12.89437867305956	12
R24_70	15.10.24	13	90250332	Frenštát pod Radhoštěm	49.549899818649955, 18.22039753552519	12
R24_33	01.10.24	16	90031856	Hradec Králové	50.245289800919025, 15.716340548641986	12
R24_35	16.08.24	24	89516841	Jinřichov na Moravě	50.075385857520835, 17.021784082984414	12
R24_52	03.10.24	6	89379501	Lázně Bělohrad	50.4531923334446, 15.576384347805757	12
R24_13	24.09.24	16	90033735	Lázně Toušeň	50.16644567738374, 14.714371223902841	12
R24_56	01.10.24	6	90445091	Lomnice nad Lužnicí	49.067069188708054, 14.748495476753135	12

Kód	Datum doručení	Počet včelstev	Registrační číslo stanoviště	Lokalita	Souřadnice stanoviště LPIS	Rezistence (%)
R24_67	17.10.24	16	90685446	Losinná u Plzně	50.47376225118216, 13.412612708844447	12
R24_29	30.08.24	12	90305254	Nasavrky	49.83916694204724, 15.853284732771941	12
R24_3	03.09.24	6	90752351	Sepekov	49.44069601304597, 14.441589124898586	12
R24_3	03.09.24	6	90752351	Sepekov	49.44069601304597, 14.441589124898586	12
R24_28	05.08.24	10	89867031	Havlíčková Borová	49.65308363593402, 15.78500801450017	19
R24_43	08.10.24	12	90750179	Losinná u Plzně	50.08661561606301, 14.23383075547027	19
R24_6	04.09.24	12	89717462	Miličín	49.53634691815183, 14.669302153801858	19
R24_19	06.09.24	6	90250130	Říčany u Brna	49.21332076555957, 16.386505663197156	19
R24_55	08.10.24	14	89913381	Svitavy	49.76605989599468, 16.36010346807103	19
R24_80	24.10.24	10	90766648	Křešice	50.52581121505815, 14.227769207870947	25
R24_57	03.10.24	18	89773925	Liběchov	50.40734559666305, 14.448593367801283	25
R24_61	15.10.24	12	90799688	Losinná u Plzně	49.83292113576914, 18.245281139304744	25
R24_62	17.10.24	8	90676693	Losinná u Plzně	50.10265838718339, 14.168195177915718	25
R24_15	19.09.24	12	90107715	Pelhřimov	49.48649698970184, 15.237892473277908	25
R24_27	12.09.24	8	89009613	Počátky	49.27669312547774, 15.265818001044142	25
R24_30	24.09.24	12	89871115	Stříbro	49.26993290986559, 13.167378952268862	25
R24_38	04.09.24	12	89705436	Šilheřovice	49.92426383415448, 18.2691881893664	25
R24_38	04.09.24	12	89705436	Šilheřovice	49.924563807117224, 18.268891360068988	25
R24_81	24.10.24	10	89773969	Štoky	49.53184,	25
R24_22	12.09.24	12	90043680	Velešín	48.715280803133034, 14.66615617261795	25
R24_84	30.10.24	10	90756322	Jindřichův Hradec	49.17591950316509, 14.908417835907315	31
R24_60	26.09.24	8	90436293	Kostelecké Horky	50.050651886490975, 16.20670907738483	31
R24_7	22.08.24	10	89542200	Pečky	50.08164321820965, 15.036030525537285	31
R24_34	02.10.24	12	90433953	Pelhřimov	49.39554967353678, 15.249506115756802	31
R24_32	10.09.24	17	89851348	Praha - Libuš	49.99997507289628, 14.451254692106097	33
R24_49	03.10.24	8	89068236	Fulnek	49.72549024495682, 17.842733342094448	37
R24_58	01.09.24	35	89204407	Nikolčice	48.99001384394531, 16.712668799496136	37

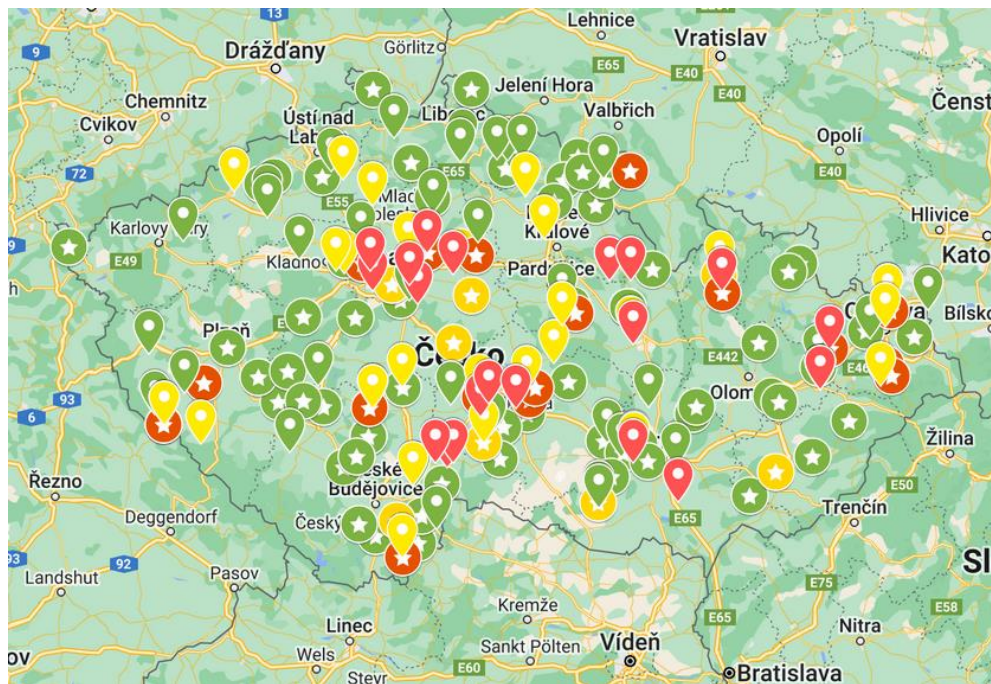
Kód	Datum doručení	Počet včelstev	Registrační číslo stanoviště	Lokalita	Souřadnice stanoviště LPIS	Rezistence (%)
R24_63	16.10.24	10		Záchlumí	50.04853, 16.35534	37
R24_50	19.09.24	5	90557039	Jihlava	49.440659563021924, 15.51107830725658	44
R24_5	14.08.24	12	90442032	Pelhřimov	49.458289649743264, 15.299327026814014	44
R24_75	11.10.24	20	89914281	Petrov nad Desnou	49.99875489741628, 17.0400591629535	44
R24_45	09.08.24	8	90031104	Zvánovice	49.938641776837365, 14.779962217658072	44
R24_66	16.10.24	16	90674691	Hlubočky	49.530311540260115, 17.763241112208753	50
R24_83	30.10.24	10	90756311	Jindřichův Hradec	49.17274028378289, 15.037727718515667	50
R24_72	17.10.24	12	90664342	Losinná u Plzně	50.09737061376263 14.423580775962899	50
R24_59	08.10.24	16	90405930	Rosice	49.174328826237684, 16.38522804890522	50
R24_73	08.10.24	10	90118627	Svitavy	49.7491896830973, 16.380011837561643	50
R24_71	22.10.24	12	90157518	Škvorec	50.02845510213665, 14.725858374821165	50
R24_4	05.09.24	16	90501869	Litol	50.18458104989376, 14.850018895331534	62
R24_10	29.08.24	16	90003406	Jindřichův Hradec	49.151104861570175, 14.991578203400847	69

Celkem bylo v období leden až listopad 2024 analýzám roztočů podrobeno 1045 včelstev

VI. Porovnání výsledků z let 2023 - 2024

V následující mapě jsou souhrnně uvedeny dosavadní výsledky. Barvy mají shodný význam a značky na mapě jsou kapky pro rok 2024 a hvězdičky pro rok 2023

Mapa 3 Výsledky let 2023 + 2024



Mapa 4 Lokality bez rezistence 2023 (hvězdička) a 2024 (kapka)



Mapa 5 Lokality s rezistencí 2023 (hvězdička) a 2024 (kapka)



VII. Diskuse

Situace na celém území je velmi podobná v obou sledovaných letech. Kontinuální sledování účinnosti léčiv proti varroáze je nezbytné pro aktualizaci doporučení, jak mají chovatelé postupovat pro dosažení maximální účinnosti léčení při minimálním počtu ošetření a co nejnižší dávce účinných látek. I při dodržení správných aplikačních postupů může nastat snížení účinnosti léčení, pokud se v populaci parazita vyskytnou jedinci rezistentní. V České republice, jak ukázaly výsledky, je situace poměrně stabilní, protože se daří ničit populaci rezistentní k pyrethroidům vhodným střídáním přípravků, zejména zimní aplikací přípravků na bázi minimální dávky amitrazu. Vzhledem k výskytu rezistentní mutace roztočů bude ale stále těžší dosahovat cíl, kterým je nulová prevalence parazitů na stanovištích včelstev v jarním období.

Nálezy mutace zapříčiňující sníženou účinnosti zásahu ve včelstvech nemá regionální výskyt, ale je rozptýlen na celém území České republiky. Z výsledků měření účinnosti z minulých let je zřejmé, že na některých stanovištích se snížená účinnost opakuje, někde došlo ke zhoršení, v některých případech ke zlepšení účinnosti. To lze vysvětlit tím, že každoroční start množení roztočů může začít z poněkud jiného zdroje, z jedinců, kteří z různých příčin přežili zimní

ošetření. Lokality, zařazené ve výše uvedených výsledcích jako "žluté", musíme klasifikovat v kontextu znalostí jejich minulosti. Může se jednat o případy nastupující rezistence, nebo také populace vracející se do běžného nemutovaného stavu.

Rezistentní roztoči nemají proti běžné populaci žádnou jinou výhodu, spíše naopak. Populace parazita, jak ukazuje i praxe, inklinuje při přerušení kontaktu s pyrethroidem k návratu genotypu "běžného" oproti mutovanému.

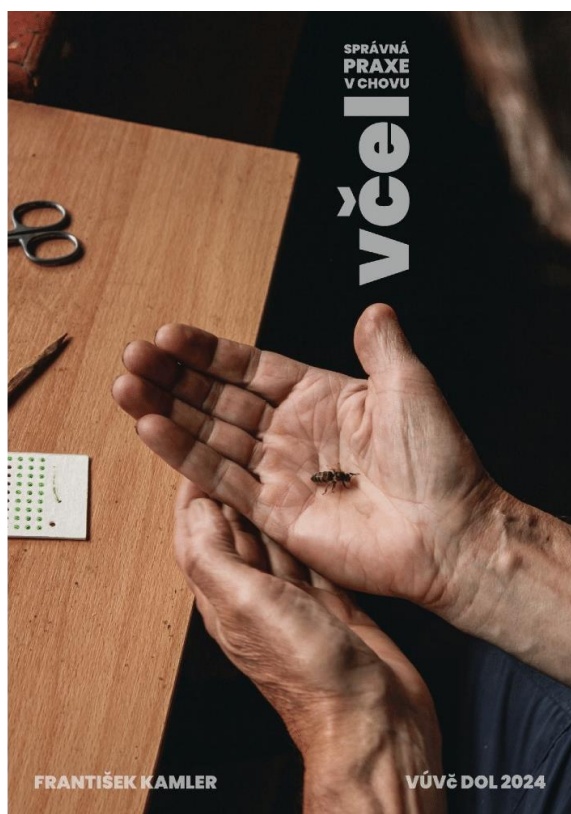
V zájmu chovatelů včel a tedy celého českého včelařství je třeba tyto poznatky komunikovat na všech úrovních.

VIII. Doporučení pro chovatele a pro veterinární dohled

1. Stanoviště otestovaná negativně na přítomnost rezistentní mutace mají předpoklad k plné účinnosti při použití registrovaných léčiv na bázi pyrethroidů za předpokladu dodržení postupu léčení, resp. dodržení příbalové informace.
2. Tento stav se může v čase změnit introdukcí jedinců s mutací, kterým by chovatel umožnil se namnožit. Proto je namísto opakovaná kontrola plné účinnosti aplikace in situ, např. pomocí kyseliny mravenčí (FORMIDOL 41 g a FORMIDOL 81 g proužky do úlu), případně thymolovými přípravky.
3. Testem na přítomnost specifické mutace byla na některých stanovištích predikována snížená účinnost pyrethroidů. Výskyt stanovišť se sníženou účinností pyrethroidů je roztroušený na celém území ČR. Na stanovištích s více než 10% výskytem mutovaných roztočů je použití pyrethroidů kontraindikované.
4. Při výskytu rezistentních roztočů vzrůstá důležitost nasazení alternativní léčby s cílem dosažení nulové prevalence na jaře. Alternativní léčiva jsou volitelná ze seznamu registrovaných léčivých přípravků (<https://uskvbl.cz/cs/registrace-a-schvalovani/registrace-vlp/seznam-vlp/aktualne-registrovane-vlp/vyhledane-pipravky-vlp>), které nemají jako svoji účinnou látku fluvalinát nebo flumethrin. Nejvíce doporučenou kombinací je léčení kyselinami po snůšce a tři ošetření fumigací bez plodu dle [Metodického pokynu SVS](#).
5. Stále platným principem úspěšného tlumení varroázy je snaha o dosažení nulové prevalence varroázy na jaře, a to hlavně lepším využitím bezplodového zimního období včelstev k likvidaci parazitů. Žádoucího bezplodového stavu lze dosáhnout klíčováním matek nebo mechanickým vyřezáním zbytků plodu.
6. Vzhledem k charakteru šíření a reinvaze varroázy v hustě zavčelené krajině České republiky je i nadále velmi vhodné a hodné doporučení, aby chovatelé postupovali koordinovaně, tedy volili strategii a střídání přípravků rozmyšleně s ohledem na předešlé výsledky. Používání genetických testů na přítomnost rezistentní mutace může velmi napomoci efektivnímu rozhodování.
7. Nabídka testu včetně metodiky je na <https://www.beedol.cz/zkusebni-laborator/detekce-rezistentnich-roztocu/>
8. V dalším období budeme dále zahušťovat odběrovou síť lokalit, provádět opakované rozbory a vyhodnocovat populace kleštíků v souvislosti s změnami ve strategii léčení.

IX. Metodika správné chovatelské praxe

Praktická doporučení pro běžné chovatele jak předcházet ztrátám včelstev dodržováním základních pravidel celoročního ošetřování včelstev a jejich léčení byla zapracována mimo jiné do nového vydání (2024) publikace [Správná praxe v chovu včel](#)



Příručku o rozsahu 30 stran vydal v tištěné formě Výzkumný ústav včelařský (ISBN: 978-80-87196-49-6) a je k dispozici v prodejnách včelařských potřeb.

X. Použitá literatura

- Alissandrakis, E., Ilias, A., Tsagkarakou, A. (2017): Pyrethroid target site resistance in Greek populations of the honey bee parasite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *Journal of Apicultural Research*, 56: 625–630.
- Anderson, D.L., Trueman, J.W.H. (2000): *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental and Applied Acarology*, 24: 165–189.
- Anonymous1 (2018): *Varroa* taxonomy. National center for biotechnology information. Navštíveno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Tree&id=62624&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>, dne 25. 9. 2018.
- Anonymous2 (2023): *Tau*-fluvalinate structure. PubMed. Navštíveno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/fluvalinate>, dne 2. 10. 2023.
- Anonymous3 (2023): Flumethrin structure. PubMed. Navštíveno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6033664#section=Top>, dne 2. 10. 2023.
- Anonymous4 (2023): Acrinathrin structure. PubMed. Navštíveno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6436606#section=2D-Structure>, dne 2. 10. 2023.
- Anonymous5 (2023): Amitraz structure. PubMed. Navštíveno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/36324#section=2D-Structure>, dne 2. 10. 2023.
- Beaurepaire, A.L., Krieger, K.J., Moritz, R.F.A. (2017): Seasonal cycle of inbreeding and recombination of the parasitic mite *Varroa destructor* in honeybee colonies and its implications for the selection of acaricide resistance. *Infection, Genetics and Evolution*, 50: 49–54.
- Beaurepaire, A.L., Truong, T.A., Fajardo, A.C., Dinh, T.Q., Cervancia, C., Moritz, R.F.A. (2015): Host specificity in the honeybee parasitic mite, *Varroa* spp. in *Apis mellifera* and *Apis cerana*. *PLoS ONE*, 10(8): e0135103.
- Binney B. M., Pragert H., Foxwell et al. 2023: Genomic analysis of the population structure of *Paenibacillus* larvae in New Zealand. *Sec. Evolutionary and Genomic Microbiology*. Volume 14.
- Biová J., Bzdil J., Dostálková S., Petřivalský M., Brus J., Carra Elena, Daníhlík J. (2021a): American Foulbrood in the Czech Republic: ERIC II Genotype of *Paenibacillus* Larvae Is Prevalent. *Sec. Veterinary Epidemiology and Economics*. Volume 8
- Biová J, Charrière JD, Dostálková S, Škrabišová M, Petřivalský M, Bzdil J, Daníhlík J. (2021b): *Melissococcus plutonius* Can Be Effectively and Economically Detected Using Hive Debris and Conventional PCR. *Insects*. Feb 9;12(2):150.
- Brown, M., Learner, J., Wilford, J. (2015): Managing *Varroa*. Leaflet. The Animal and Plant Health Agency National Agri-Food Innovation Campus, York, Velká Británie.
- Casida, J.E., Durkin, K.A. (2013): Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annual Review of Entomology*, 58: 99–117.

Cornman, R.S., Schatz, M.C., Johnston, J.S., Chen, Y.-P., Pettis, J., Hunt, G., Bourgeois, L., Elsik, C., Anderson, D., Grozinger, C.M., Evans, J.D. (2010): Genomic survey of the ectoparasitic mite *Varroa destructor*, a major pest of the honey bee *Apis mellifera*. *BioMed Central Genomics*, 11: 602.

Čermák, K., Gruna, B., Hajdušková, J., Holub, P., Klíma, Z., Kovařík, I., Navrátil, S., Texl, P., Texl, F., Rytina, Tůma, Z. (2016): Včelařství, 1. díl. Pracovní společnost nástavkových včelařů CZ, z.s. České Budějovice, Česká republika.

Čukanová E, Prodělalová J, Palíková M, Kováčová K, Linhart P, Papežiková I. Can the examination of different types of hive samples be a non-invasive method for detection and quantification of viruses in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies? *J Vet Res*. 2023 Sep 20;67(3):323-331.

Davies, T.G., Field, L.M., Usherwood, P.N., Williamson, M.S. (2007): DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB Life*, 59: 151–162.

De Jong, D., De Jong, P.H., Goncalves, L.S. (1982): Weight loss and other damage to developing worker honey bees from infestation with *Varroa jacobsoni*. *Journal of Apicultural Research*, 21: 165–167.

De La Folia, A.G., Bain, S.A., Ross, L. (2015): Haplodiploidy and the reproductive ecology of Arthropods. *Current Opinion in Insect Science*, 9: 36–43.

De Ruijter, A., Pappas, N. (1983): Karyotype and sex determination of *Varroa jacobsoni* Oud. affecting honey bees: present status and needs. *Proceeding of a meeting of the EC Experts' Group*, 41–44, Itálie.

Dynes, T.L., De Roode, J.C., Lyons, J.I., Berry, J.A., Delaplane, K.S., Brosi, B.J. (2016): Fine scale population genetic structure of *Varroa destructor*, an ectoparasitic mite of the honey bee (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 50: 49–54.

Elzen, P.J., Baxter, J.R., Spivak, M., Wilson, W.T. (2000): Control of *Varroa jacobsoni* Oud. resistant to fluvalinate and amitraz using coumaphos. *Apidologie*, 31: 437–441.

Erdem, E., Koç-İnak, N., Rüstemoğlu, M., & İnak, E. (2024). Geographical distribution of pyrethroid resistance mutations in *Varroa destructor* across Türkiye and a European overview. *Experimental and Applied Acarology*, 92(3), 309-321.

Evans, J., Lopez, D. (2002): Complete mitochondrial DNA sequence of the important honey bee pest, *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *Experimental and Applied Acarology*, 27: 69–78.

Evans, J.D. (2000): Microsatellite loci in the honey bee parasitic mite *Varroa jacobsoni*. *Molecular Ecology*, 9: 1436–1438.

Farjamfar, M., Saboori, A., González-Cabrera, J., Hernández Rodríguez, C.S. (2018): Genetic variability and pyrethroid susceptibility of the parasitic honey bee mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in Iran. *Experimental and Applied Acarology*, 76: 139–148.

Forfert, N., Natsopoulou, M.E., Frey, E., Rosenkranz, P., Paxton, R.J., Moritz, R.F.A. (2015): Parasites and pathogens of the honeybee (*Apis mellifera*) and their influence on inter-colonial transmission. *PLoS One*, 10(10): e0140337.

- Frey, E., Rosenkranz, P. (2014): Autumn invasion rates of *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) into honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies and the resulting increase in mite populations. *Journal of Economic Entomology*, 107: 508–515.
- Fries, I., Imdorf, A., Rosenkranz, P. (2006): Survival of mite infested (*Varroa destructor*) honey bee (*Apis mellifera*) colonies in a Nordic climate. *Apidologie*, 37: 564–570.
- Fuchs, S., Langenbach, K. (1989): Multiple infestation of *Apis mellifera* L. brood cells and reproduction in *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*, 20: 257–266.
- Hamilton, W.D. (1967): Extraordinary sex ratios. *Science*, 156: 477–488.
- Hubert, J., Erban, T., Kamler, M., Kopecký, J., Nesvorná, M., Hejdanková, S., Titěra, D., Tyl, J., Zurek, L. (2015): Bacteria detected in the honeybee parasitic mite *Varroa destructor* collected from beehive winter debris. *Journal of Applied Microbiology*, 119: 640–654.
- Hubert, J., Nesvorná, M., Doskočil, I., Kamler, M., Stará, J. (2018): Certifikovaná metodika pro hodnocení rezistence roztoče *Varroa destructor* vůči tau-fluvalinátu. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., ISBN 978-80-7427-280-6.
- Hubert, J., Nesvorná, M., Kamler, M., Kopecký, J., Tyl, J., Titěra, D., Stará, J. (2013): Point mutations in the sodium channel gene conferring tau-fluvalinate resistance in *Varroa destructor*. *Pest Management Science*, 70: 889–894.
- Hubert, J., Nesvorná, M., Stará, J. (2017): Poznatky o rezistenci klesťáka zhoubného (*Varroa destructor*) vůči akaricidům. *Veterinářství*, 67: 560–566.
- Jeřábková V., Látal T., Bodrinová M., Titěra D., Bazgerová E., Titěra D. 2019: Uživatelské identifikační spektrum pro identifikaci kmenů druhu *Melisococcus plutonius* metodou MALDI-TOF. Funkční vzorek.
- Jeyaparakash, A., Hoy, M.A. (2009): First divergence time estimate of spiders, scorpions, mites and ticks (subphylum: Chelicerata) inferred from mitochondrial phylogeny. *Experimental and Applied Acarology*, 47: 1–18.
- Kamler, M., Nesvorna, M., Stara, J., Erban, T., Hubert, J. (2016): Comparison of tau-fluvalinate, acrinathrin, and amitraz effects on susceptible and resistant populations of *Varroa destructor* in a vial test. *Experimental and Applied Acarology*, 69: 1–9.
- Kliot, A., Ghanim, M. (2012): Fitness costs associated with insecticide resistance. *Pest Management Science*, 68: 1431–1437.
- Kunc M, Dobeš P, Ward R, Lee S, Čegan R, Dostálková S, Holušová K, Hurychová J, Eliáš S, Pind'áková E, Čukanová E, Prodělalová J, Petřivalský M, Danihlák J, Havlík J, Hobza R, Kavanagh K, Hyršl P. Omics-based analysis of honey bee (*Apis mellifera*) response to *Varroa* sp. parasitisation and associated factors reveals changes impairing winter bee generation. *Insect Biochem Mol Biol.* 2023 Jan;152:103877.
- Maggi, M.D., Ruffinengo, S.R., Mendoza, Y., Ojeda, P., Ramallo, G., Floris, I., Eguaras, M.J. (2011): Susceptibility of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) to synthetic acaricides in Uruguay: *Varroa* mites' potential to develop acaricide resistance. *Parasitology Research*, 108: 815–821.

- Martin, S.J. (1994): Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in worker brood of the honey bee *Apis mellifera* L. under natural conditions. *Experimental and Applied Acarology*, 18: 87–100.
- Martin, S.J. (2004): Acaricide (pyrethroid) resistance in *Varroa destructor*. *Bee World*, 85: 67–69.
- Martin, S.J., Cook, C. (1996): Effect of host brood type on number of offspring produced by the honeybee parasite *Varroa jacobsoni*. *Experimental and Applied Acarology*, 20: 387–390.
- Martin, S.J., Holland, K., Murray, M. (1997): Non-reproduction in honeybee mite *Varroa jacobsoni*. *Experimental and Applied Acarology*, 21: 539–549.
- McGruddy, R., Bulgarella, M., Felden, A., Baty, J.W., Haywood, J., Stahlmann-Brown Ph. & Lester, Ph.J. (2024) Are increasing honey bee colony losses attributed to *Varroa destructor* in New Zealand driven by miticide resistance? *Journal of Apicultural Research*, 63:4, 648-659.
- Milani, N. (1995): The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to pyrethroids: a laboratory assay. *Apidologie*, 26: 415–429.
- Millán-Leiva, A., Hernández-Rodríguez, C.S., González-Cabrera, J. (2018): New PCR–RFLP diagnostics methodology for detecting *Varroa destructor* resistant to synthetic pyrethroids. *Journal of Pest Science*, 91: 937–941.
- Mondet, F., de Miranda, J.R., Kretzschmar, A., Le Conte, Y., Mercer, A.R. (2014): On the front line: quantitative virus dynamics in honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies along a new expansion front of the parasite *Varroa destructor*. *PLoS ONE Pathology*, 10(8): e1004323.
- Münstedt, K., Münstedt, K.P., Teichfischer, P. (2015): Přehled virů napadajících včelstva. *Moderní včelař*, 12, 3: 22.
- Narahashi, T. (1996): Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. *Pharmacology and Toxicology*, 78: 1–14.
- Narahashi, T. (2000): Neuroreceptors and ion channels as the basis for drug action: past, present, and future. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 294: 1–26.
- Navajas, M., Anderson, D.L., de Guzman, L.I., Huang, Z.Y., Clement, J., Zhou, T., Le Conte, Y. (2010): New Asian types of *Varroa destructor*: a potential new threat for world apiculture. *Apidologie*, 41: 181–193.
- Navajas, M., Solignac, M., Le Conte, Y., Cros-Arteil, S., Cornuet, J. (2002): The complete sequence of the mitochondrial genome of the honey-bee ectoparasite *Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata). *Molecular Biology and Evolution*, 19: 2313–2317.
- O'Reilly, A.O., Khambay, B.P., Williamson, M.S., Field, L.M., Wallace, B.A., Davies, T.G. (2006): Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel. *Biochemistry Journal*, 396: 255–263.
- O'Reilly, A.O., Williamson, M.S., González-Cabrera, J., Turberg, A., Field, L.M., Wallace, B.A., Davies, T.G.E. (2014): Predictive 3D modelling of the interactions of pyrethroids with the voltage-gated sodium channels of ticks and mites. *Pest Management Science*, 70: 369–377.

Prodělalová J., Čukanová E., Moutelíková R., Titěra D. (2017): Risk of honeybee viruses spreading during artificial insemination of queen bees. *Veterinářství*, vol. 67, No. 7, 554-558, ref. 38.

Prodělalová J., Titěra D. (2018): Jak včelařit s viry, přehled informací o virech včely medonosné. Vydal: Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i. ISBN 978-80-88233-50-3

Prodělalová, J., Moutelíková, R., Titěra, D. (2019). Multiple Virus Infections in Western Honeybee (*Apis mellifera* L.) Ejaculate Used for Instrumental Insemination. *Viruses*, 11(4), 306.

Ramsey, S.D., Ochoa, R., Bauchan, G., Gulbranson, C., Mowery, J.D., Cohen, A., Lim, D., Joklik, J., Cicero, J.M., Ellis, J.D., Hawthorne, D., vanEngelsdorp, D. (2019): *Varroa destructor* feed primarily on honey bee fat body not hemolymph. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 116: 1792–1801.

Rehm, S.-M., Ritter, W. (1989): Sequence of the sexes in the offspring of *Varroa jacobsoni* and the resulting consequences for calculation of the developmental period. *Apidologie*, 20: 339–343.

Rosenkranz, P., Aumeier, P., Ziegelmann, B. (2010): Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103: 96–119.

Sabelis, M.W., Nagelkerke, C.J. (1992): Sex allocation and pseudo-arrhenotoky in phytoseiid mites: an overview. Evolution and diversity of sex ratio in insects and mites. *Experimental and Applied Acarology*, 4: 512–541.

Sammataro, D., Untalan, P., Guerrerob, F., Finleya, J. (2005): The resistance of *Varroa* mites (Acari: Varroidae) to acaricides and the presence of esterase. *International Journal of Acarology*, 31: 67–74.

Sammataro, D., Yoder, J.A. (2011): Honey bee colony health: challenges and sustainable. Chemical Rubber Company (CRC) Press, First edition. Oxford, Velká Británie.

Smissaert, H.R. (1964): Cholinesterase inhibition in spider mites susceptible and resistant to organophosphate. *Science*, 143: 129–131.

Soderlund, D.M. (2008): Pyrethroids, knockdown resistance and sodium channels. *Pest Management Science*, 64: 610–616.

Soderlund, D.M. (2010): State-dependent modification of voltage gated sodium channels by pyrethroids. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 97: 78–86.

Soderlund, D.M. (2012): Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: recent advances. *Archives of Toxicology*, 86: 165–181.

Solignac, M., Cornuet, J.M., Vautrin, D., Le Conte, Y., Anderson, D., Evans, J., Cros-Arteil, S., Navajas, M. (2005): The invasive Korea and Japan types of *Varroa destructor*, ectoparasitic mites of the Western honeybee (*Apis mellifera*), are two partly isolated clones. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272: 411–419.

Solignac, M., Vautrin, D., Pizzo, A., Navajas, M., Le Conte, Y., Cornuet, J.-M. (2003): Characterization of microsatellite markers for the apicultural pest *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) and its relatives. *Molecular Ecology Notes*, 3: 556–559.

Spreafico, M., Eordegh, F.R., Bernardinelli, I., Colombo, M. (2001): First detection of strains of *Varroa destructor* resistant to coumaphos. Results of laboratory tests and field trials. *Apidologie*, 32: 49–55.

Státní veterinární správa ČR; svscr.cz

Mapové výstupy ohnisek nákaz včel a ochranných pásem; Státní veterinární správa ČR; <https://www.svscr.cz/mapove-vystupy-ohnisek-nebezpecnych-nakaz-a-ochrannych-pasem/>

Stará, J., Pekár, S., Nesvorná, M., Erban, T., Vinšová, H., Kopecký, J., Doskočil, I., Kamler, M., Hubert, J. (2019): Detection of *tau*-fluvalinate resistance in the mite *Varroa destructor* based on the comparison of vial test and PCR–RFLP of *kdr* mutation in sodium channel gene. *Experimental and Applied Acarology*, 77:161–171.

Steiner, J., das Graças Pompolo, S., Takahashi, C.S., Gonçalves, L.S. (1982): Cytogenetics of the acarid *Varroa jacobsoni*. *Revista Brasileira de Genética*, 5: 841–844.

Strachecka, A., Borsuk, G., Olszewski, K., Paleolog, J. (2015): A new detection method for a newly revealed mechanism of pyrethroid resistance development in *Varroa destructor*. *Parasitology Research*, 114: 3999–4004.

Thompson, H., Ball, R., Brown, M., Bew, M. (2003): *Varroa destructor* resistance to pyrethroid treatments in the United Kingdom. *Bulletin of Insectology*, 56: 175–181.

van Dooremalen, C., Stam, E., Gerritsen, L., Cornelissen, B., van der Steen, J., van Langevelde, F., Blacquiere, T. (2013): Interactive effect of reduced pollen availability and *Varroa destructor* infestation limits growth and protein content of young honey bees. *Journal of Insect Physiology*, 59: 487–493.

Van Leeuwen, T., Dermauw, W. (2016): The molecular evolution of xenobiotic metabolism and resistance in chelicerate mites. *Annual Review of Entomology*, 61: 475–498.

Van Leeuwen, T., Vanholme, B., Van Pottelberge, S., Van Nieuwenhuyse, P., Nauen, R., Tirry, L., Denholm, I. (2008): Mitochondrial heteroplasmy and the evolution of insecticide resistance: non-Mendelian inheritance in action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 5980–5985.

Wang, R., Huang, Z.Y., Dong, K. (2003): Molecular characterization of an arachnid sodium channel gene from the *Varroa* mite (*Varroa destructor*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33: 733–739.

Wang, R., Liu, Z., Dong, K., Elzen, P.J., Pettis, J., Huang, Z. (2002): Association of novel mutations in a sodium channel gene with fluvalinate resistance in the mite, *Varroa destructor*. *Journal of Apicultural Research*, 41: 17–25.

Wang, Z., Zhou, X., Lin, Q., Fang, W., Chen, X. (2011): New primers for sex identification in the Chinese Egret and other ardeid species. *Molecular Ecology Resources*, 1: 176–179.

Watkins, M. (1997): Resistance and its relevance to beekeeping. *Bee World*, 78: 15–22.

Watkins, M. (2011): Chemical control of *Varroa*. Carreck, N.L. (ed.) *Varroa: still a problem in the 21st century?* International Bee Research Association, 33–42, Cardiff, Velká Británie.

Wilfert, L., Long, G., Leggett, H.C., Schmid-Hempel, P., Butlin, R., Martin, S.J.M., Boots, M. (2016): Deformed wing virus is a recent global epidemic in honeybees driven by *Varroa*

mites. Science, 80: 351.

Zákon č. 166/1999 Sb. Zákon o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů (veterinární zákon). S účinností od 28. 09. 1999. Zdroj: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1999-166>

