

# Tropileloza

---

**Kukovec, Ana-Marija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:566671>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-28**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -  
Repository of PHD, master's thesis](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET

Ana-Marija Kukovec

Tropileloza

Diplomski rad

Zagreb, 2023.

Sveučilište u Zagrebu  
Veterinarski fakultet  
Zavod za biologiju i patologiju riba i pčela

Predstojnik: doc. dr. sc. Krešimir Matanović

Mentorica: prof. dr. sc. Ivana Tlak Gajger

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. prof. dr. sc. Kristina Matković
2. prof. dr. sc. Srebrenka Nejedli
3. prof. dr. sc. Ivana Tlak Gajger
4. doc. dr. sc. Krešimir Matanović (zamjena)

*Rad je izrađen na Zavodu za biologiju i patologiju riba i pčela Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.*

## ZAHVALE

Posebno zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Ivani Tlak Gajger na pomoći pri izradi ovog diplomskog rada kao i djelatnicima Zavoda za biologiju i patologiju pčela na tehničkoj pomoći. Najljepše hvala mojim roditeljima Meliti i Josipu i bratu Borisu-Marku na podršci i pomoći tijekom studiranja. Na kraju se posebno zahvaljujem svom dragom Daliboru na tome što mi je bio velika potpora i oslonac.

## POPIS SLIKA I TABLICA

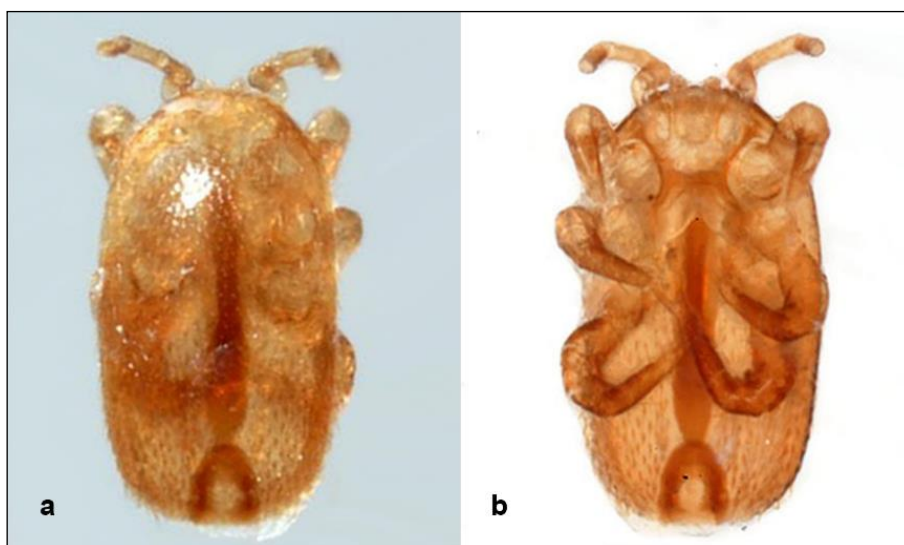
Slika 1. <i>Tropilaelaps</i> spp., dorzalna strana (a), ventralna strana (b).....	1
Slika 2. Geografska proširenost tropileloze .....	4
Slika 3. <i>Tropilaelaps mercedesae</i> , ženka, ventralna strana.....	6
Slika 4. <i>Tropilaelaps clareae</i> , ventralna strana.....	7
Slika 5. <i>Tropilaelaps</i> spp. grinja, pričvršćena na pčelinjoj ličinci (a), na pčelinjoj kukuljici (b) .....	8
Slika 6. Obitelj grinja <i>Tropilaelaps mercedesae</i> s „majkom“ grinjom (svijetlo-smeđe boje) i različitim razvojnim nimfalnim stadijima potomstva (bijele boje).....	8
Slika 7. Životni ciklus <i>Tropilaelaps mercedesae</i> na europskoj medonosnoj pčeli .....	9
Slika 8. Štete prouzročene sa grinjama <i>Tropilaelaps mercedesae</i> na leglu europske medonosne pčele ( <i>Apis mellifera</i> ).....	12
Slika 9. Prikaz deformiranih primjeraka mladih pčela s ili bez nogu, s vidljivo nepravilno građenim krilima ili bez njih, te skraćenim zatkom.....	14
Slika 10. Otklapanje pčelinjeg legla pomoću pčelarske vilice.....	16
Slika 11. Izdvajanje sumnjivih grinja primjenom metode šećera u prahu (a i b).....	18
Slika 12. Pregled podloške s podnice košnice na prisutnost grinja.....	19
Slika 13. Ljepljiva podloška podnice prekrivena ostacima iz košnice.....	20
Slika 14. Usporedba <i>Varroa</i> spp. (lijevo) sa <i>Tropilaelaps</i> spp. (desno) .....	27
Slika 15. Usporedba jedne ženke <i>Tropilaelaps mercedesae</i> (lijevo) s dvije ženke <i>Varroa</i> <i>jacobsoni</i> (desno), na ličinci <i>Apis mellifera</i> .....	28
Slika 16. Prikaz različitih vrsta grinja, <i>Braula coeca</i> (muha; vrh), <i>Varroa</i> spp. (desno), <i>Tropilaelaps</i> spp. (dno), peludna grinja (lijevo) .....	28
Slika 17. Paketni roj medonosnih pčela, koji sadrži samo odrasle pčele i jednu maticu .....	31
Tablica 1. Prikaz svih vrsta grinja iz roda <i>Tropilaelaps</i> , koje parazitiraju na različitim vrstama medonosnih pčela.....	5
Tablica 2. Prikaz slijeda F i R početnica (5'-3') koje se najčešće koriste u istraživanju <i>Tropilaelaps</i> spp. grinja, za amplifikiranje fragmenta specifičnog gena. ....	26

## SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
2. Pregled rezultata dosadašnjih istraživanja .....	3
2.1. Geografska proširenost tropileloze .....	3
2.2. Etiologija.....	4
2.2.1. Morfologija grinja .....	5
2.2.2. Životni ciklus grinja .....	7
2.2.3. Metoda proučavanja razvoja grinja na europskoj medonosnoj pčeli .	10
2.2.4. Metoda proučavanja razvoja grinja na azijskoj divovskoj pčeli .....	10
2.2.5. Metoda proučavanja razvoja grinja za vrijeme parenja.....	10
2.3. Epizootologija.....	11
2.4. Klinička slika .....	11
2.4.1. Patogenost <i>Tropilaelaps</i> spp. grinja i njihova povezanost s pčelinjim virusima .....	13
2.5. Dijagnostika tropileloze.....	15
2.5.1. Terenska dijagnostika na pčelinjaku .....	15
2.5.1.1. Prikupljanje sumnjivih grinja iz pčelinjeg legla .....	16
2.5.1.2. Prikupljanje sumnjivih grinja s odraslih pčela.....	17
2.5.1.3. Pregled na ljepljivoj podlozi .....	18
2.5.2. Laboratorijska dijagnostika .....	21
2.5.2.1. Morfološka identifikacija sumnjivih grinja .....	21
2.5.2.2. Molekularne dijagnostičke metode .....	24
2.6. Diferencijalna dijagnostika .....	27
2.7. Kontroliranje tropileloze.....	28
2.7.1. Akaricidi .....	29
2.7.2. Biotehnoške metode .....	29
2.8. Profilaksa .....	30
2.9. Gospodarske štete .....	32
3. Zaključak.....	34
4. Literatura .....	35
5. Sažetak .....	44
6. Summary .....	45
7. Životopis .....	46

## 1. UVOD

Tropileloza je nametnička bolest pčelinjeg legla uzrokovana grinjama iz roda *Tropilaelaps*, koji uključuje četiri vrste: *Tropilaelaps clareae*, *Tropilaelaps koenigerum*, *Tropilaelaps thaii* i *Tropilaelaps mercedesae*. *Tropilaelaps* spp. grinje su porijeklom iz Azije i prirodno parazitiraju na divovskoj azijskoj pčeli (*Apis dorsata*). Uvozom europske medonosne pčele (*Apis mellifera*) na području Azije, ove grinje su prešle sa svog izvornog nosioca na europsku medonosnu pčelu. S obzirom na činjenicu da se danas gospodari europskom medonosnom pčelom diljem cijele Azije, *Tropilaelaps* spp. grinje predstavljaju za nju jednu od najvećih prijetnji (BURGETT i sur., 1983.; WOYKE, 1985a.; ANDERSON i MORGAN, 2007.; DAINAT i sur., 2009.). Dvije vrste grinja *T. clareae* i *T. mercedesae* sposobne su parazitirati na europskoj medonosnoj pčeli (ANDERSON i MORGAN, 2007.). Svi razvojni oblici ove grinje su ektoparaziti, koji se hrane hemolimfom pčelinjih ličinki i kukuljica radilačkog i/ili trutovskog pčelinjeg legla oduzimajući im esencijalne hranjive tvari nužne za njihov rast i razvoj.



Slika 1. *Tropilaelaps* spp., dorzalna strana (a), ventralna strana (b) (BEEAWARE; Copyright FERA, 2018.).

Invazije sa *Tropilaelaps* spp. grinjama nanose ozbiljne štete pčelinjim zajednicama. Simptomi invazije nalikuju simptomima invazije grinjom *Varroa destructor* i zajednički se nazivaju sindromom nametničke grinje (eng. *parasitic mite syndrom*). Uočljivi simptomi invazije su: nepravilno raspoređeno poklopljeno i nepoklopljeno leglo, mnoštvo uginulih pčelinjih ličinki/kukuljica, deformirane mlade odrasle pčele sa smanjenim zatkom, kojima nedostaju noge ili krila, smanjenom tjelesnom masom i posljedično skraćenim životnim



vijekom. Jake invazije mogu dovesti do propadanja cijele pčelinje zajednice ili odrasle pčele napuštaju košnicu u obliku roja. *Tropilaelaps* spp. grinje mogu biti mehanički i/ili biološki prijenosnici za neke pčelinje viruse i na taj način mogu sekundarno nepovoljno utjecati na zdravlje pčela.

Tropileloza je ograničena na područje tropske i suptropske Azije gdje ove grinje uzrokuju ozbiljne štete u pčelarstvu. U posljednjih 40-ak godina njihova geografska raširenost se značajno povećala. Iako se tropileloza zasad službeno nije proširila izvan Azije, smatra se da se lako može proširiti i postati značajna prijetnja pčelarstvu na svjetskoj razini i to uglavnom putem trgovine, odnosno uvozom pčela, rojeva, matica, pčelinjih proizvoda i opreme. Tropileloza se nalazi na OIE listi (WOAH, *World Organisation of Animal Health*) opasnih bolesti, koje ugrožavaju pčelarstvo diljem cijelog svijeta.

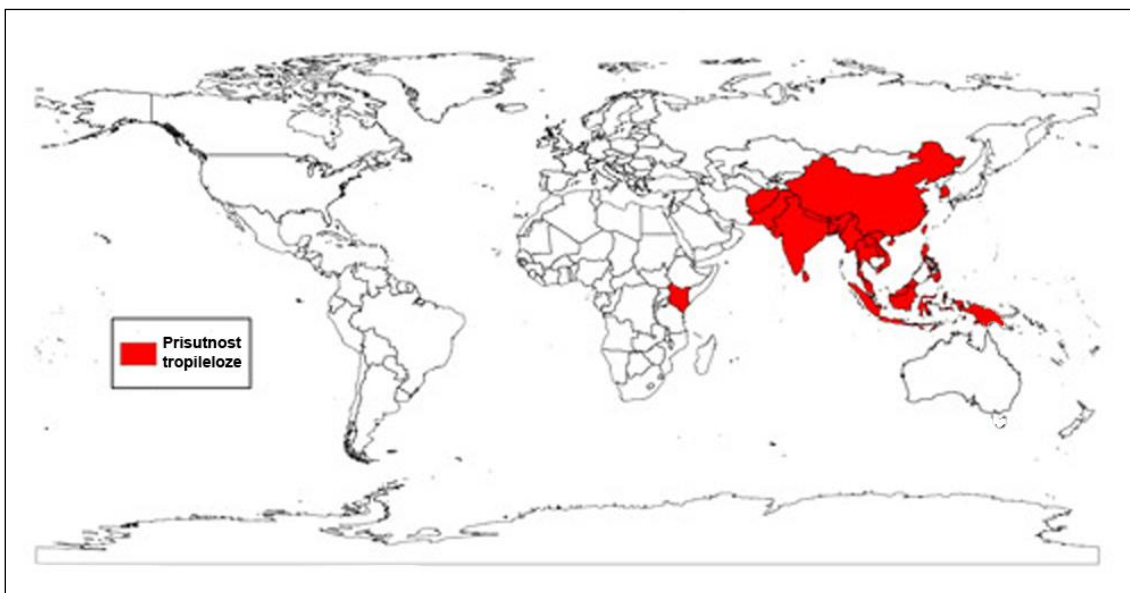
Cilj ovog diplomskog rada je pobliže rastumačiti i opisati najnovija znanstvena saznanja o biologiji *Tropilaelaps* spp. grinja, načinu širenja tropileloze, štetnim učincima na pojedinačnoj pčeli i na razini cijele pčelinje zajednice, brzim dijagnostičkim postupcima i načinima prevencije i suzbijanja bolesti.

## 2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

### 2.1. Geografska proširenost tropileloze

Tropileloza se prvobitno nalazila u Indoneziji, ali se posljednjih 40-ak godina znatno povećala geografska raširenost ove nametničke bolesti. Najčešće se javlja u tropskim i subtropskim krajevima Azije iz razloga što pčelinje zajednice uzgajaju leglo tijekom cijele godine, a ono je neophodno za razvoj invazije ovih grinja.

*T. clareae* je prvi puta otkrivena na europskoj medonosnoj pčeli na Filipinima (DELFINADO i BAKER, 1961.), a potvrđena je i kod *A. dorsata* u Indiji, Pakistanu, Mijanmaru, Nepal, Tajlandu, Filipinima, Indoneziji (Borneo) i u Afganistanu (DELFINADO-BAKER i BAKER, 1982.; TANGJINGJAI i sur., 2003.). *Tropilaelaps* spp. grinje pronađene su diljem većeg dijela Azije (ANDERSON i MORGAN, 2007.) i invadiraju veliki raspon pčelinjih vrsta (BAILEY i BALL, 1991.; SCHMID-HEMPEL, 1998.). Međutim, tropileloza je i dalje ograničena na područje Azije i granična područja (ANDERSON i ROBERTS, 2013.). Prema podacima WOAHA tropileloza se javlja u Afganistanu, Kini, Indiji, Indoneziji, Koreji, Maleziji, Mijanmaru, Nepal, Pakistanu, Filipinima, Šri Lanki, Tajlandu, Vijetnamu. Početkom 90-tih godina prošlog stoljeća, tropileloza je prijavljena i u Keniji (KUMAR i sur., 1993.; MATHESON, 1997.), ali bez laboratorijske potvrde. U Papui Novoj Gvineji, bolest je prvi puta registrirana 80-tih godina prošlog stoljeća (DELFINADO i AGGARWAL, 1987.; ANDERSON, 1994.; LEE, 1995.; OWEN, 2011.; ANDERSON i ROBERTS, 2013.). Tropileloza nije nikada službeno prijavljena u Europi, Sjevernoj Americi, Srednjoj Americi i Južnoj Americi, kao ni u Australiji i Novom Zelandu.



Slika 2. Geografska proširenost tropileloze (ELLIS i MUNN, 2005.).

## 2.2. Etiologija

Uzročnik tropileloze su grinje *Tropilaelaps* spp., koje pripadaju razredu Arachnida, podrazredu Acari, redu Parasitiformes, podredu Mesostigmata i u porodicu Laelapidae (SMILEY, 1991.) unutar koje se nalazi rod *Tropilaelaps*. Unutar roda *Tropilaelaps* nalaze se četiri vrste: *T. clareae* (DELFINADO i BAKER, 1961.), *T. koenigerum* (DELFINADO-BAKER i BAKER, 1982.), *T. mercedesae* (ANDERSON i MORGAN, 2007.) i *T. thaii* (ANDERSON i MORGAN, 2007.). Primarni nosilac ovih grinja je divovska azijska pčela, točnije rečeno njezine podvrste *A. dorsata dorsata*, *A. dorsata binghami*, *A. dorsata breviligula* i *A. dorsata laboriosa*. Molekularnim istraživanjima potvrđeno je da *T. clareae* parazitira na divovskoj azijskoj pčeli *A. d. breviligula* na Filipinima (osim Palawan otoka). Također parazitira i na uvezenoj europskoj medonosnoj pčeli na Filipinima, ali i na *A. d. binghami* na Sulawesi otoku u Indoneziji. *T. mercedesae*, koja je prije pogrešno smatrana za *T. clareae*, zajedno s *T. koenigerum* parazitira na *A. d. dorsata* na kopnenom dijelu Azije i Indonezije (osim otoka Sulawesi) i na *A. d. laboriosa* u ostalim dijelovima Azije uključujući otok Palawan. *T. mercedesae* također parazitira na uvezenoj europskoj medonosnoj pčeli na području Azije. *T. thaii* parazitira na *A. d. laboriosa* u planinskim područjima Himalaje (ANDERSON i MORGAN, 2007.). Za razliku od *V. destructor* grinja kod kojih se svega nekoliko genotipova uspjelo prilagoditi na parazitiranje na *A. mellifera*, kod *Tropilaelaps* spp. grinja je znatno manje izražena specifičnost za nosioca. Iako su *Tropilaelaps* spp. grinje manje vrsno specifične od *Varroa* spp. grinja i dalje su relativno vrsno specifične u odnosu na neke

druge grinje kao što je primjerice vodena grinja *Protzia eximia*, koja parazitira na različitim kukcima.

S obzirom na prikupljene podatke *T. koenigerum* i *T. thaii*, parazitiraju samo na azijskim vrstama (ANDERSON i MORGAN, 2007.). Vrlo rijetko se *Tropilaelaps* spp. grinje mogu pronaći i u zajednicama drugih azijskih vrsta pčela i to kod *Apis cerana* i *Apis florea*, ali dosad nije zabilježeno da su uspješno stvarale potomstvo (OTIS i KRALJ, 2001.). Iznimka od navedenog je slučaj na Tajlandu gdje je pronađena ženka *T. mercedesae* kako polaže jaja uz leglo *A. cerana* (ANDERSON i MORGAN, 2007.). Autori ovaj nalaz komentiraju više kao iznimku nego pravilo.

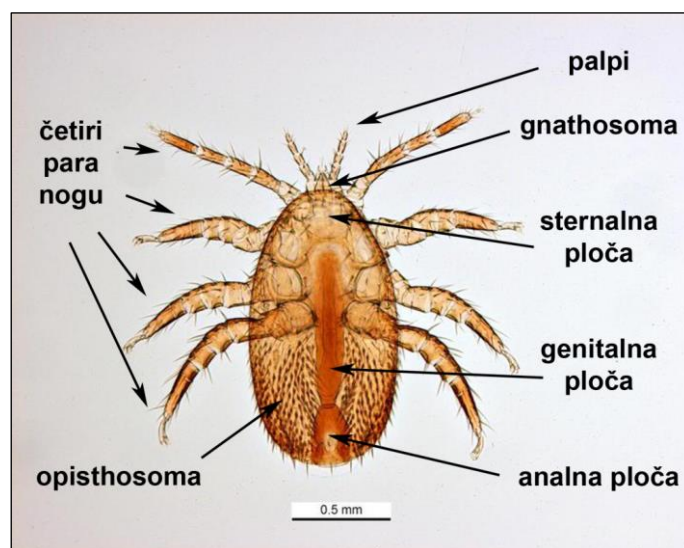
Tablica 1. Prikaz svih vrsta grinja iz roda *Tropilaelaps*, koje parazitiraju na različitim vrstama medonosnih pčela.

	<i>A. dorsata</i>	<i>A. laboriosa</i>	<i>A. mellifera</i>	<i>A. cerana</i>	<i>A. florea</i>	<i>A. breviligula</i>
<i>T. clareae</i>	nosilac	nosilac	nosilac	nosilac	nosilac	nosilac
<i>T. koenigerum</i>	nosilac	nosilac	—	nosilac	nosilac	—
<i>T. thaii</i>	—	nosilac	—	—	—	—
<i>T. mercedesae</i>	nosilac	nosilac	nosilac	—	—	—

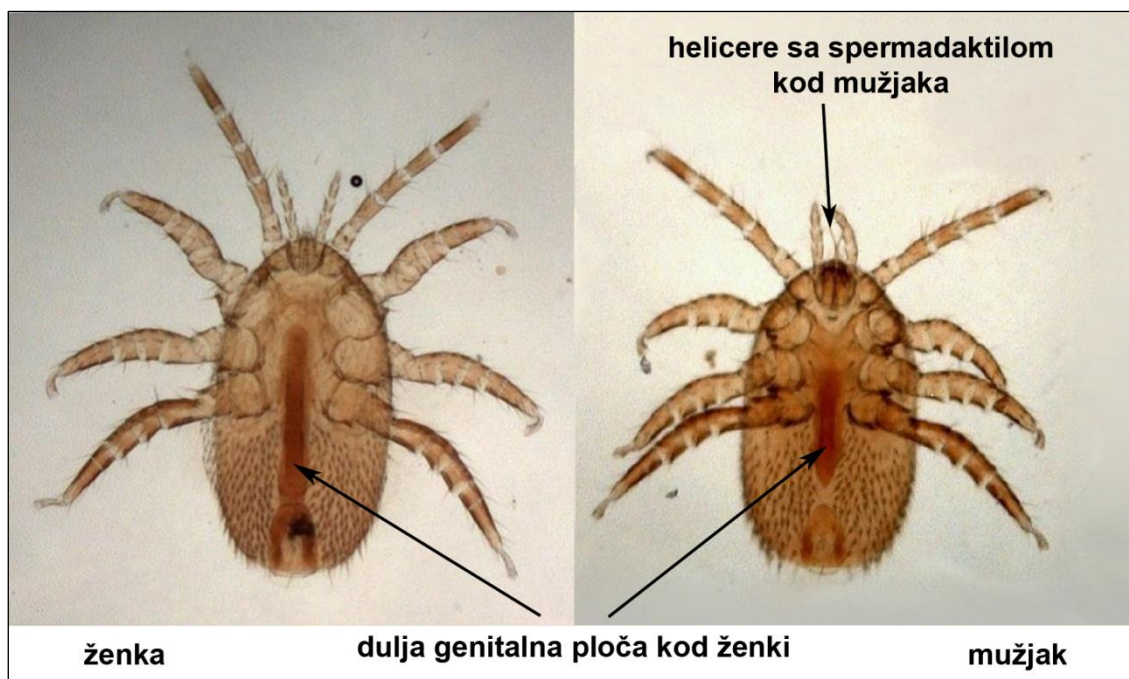
### 2.2.1. Morfologija grinja

Odrasli primjerci grinja imaju izdužen oblik tijela s jako skleroziranim egzoskeletom i vidljive golim okom. Bolje rečeno tijelo im je duže, nego šire (omjer dužine i širine je 1,3). Tijelo je prekriveno kratkim dlačicama i obično je crvenkasto smeđe boje. Približno su dugačke od 0,6 mm do 1 mm i široke od 0,4 mm do 0,5 mm. Tjelesna dužina ovisi o vrsti i varira između mužjaka i ženki gdje su mužjaci neznatno manji. Posjeduju četiri para nogu od kojih je prvi par nogu položen prema naprijed i izgledom podsjeća na ticalo. Tijelo ovih grinja je nesegmentirano, odnosno prosoma (cephalotorax) i opisthosoma (zadak) su spojeni u jednu vidljivu cjelinu (ideosomu). S dorzalne strane tijela nalazi se dorzalni štit dok se s ventralne strane nalazi više ventralnih štitova i to redom: sternalna ploča, koja je retikularna, odnosno izgledom podsjeća na riblju ljusku ili zdrobljenu ljusku jajeta, izdužena genitalna ploča (epigynium), koja je posteriorno zaobljena ili oštra i analna ploča trokutastog oblika, koja uokviruje analni otvor. Genitalna ploča je najmanje dva puta duža od analne ploče. Gnathosoma poznata i pod nazivom capitulum je dio tijela grinja, koji uključuje usta i usne dijelove (hypostomu, dvije helicere i dvije osjetne pedipalpe), smještena je anteroventralno. Kaudalno

na gnathostomi nalazi se tritosternum, senzorni organ oblika slova Y. Između kukova trećeg i četvrtog para nogu, nalazi se jedan par latero-ventralnih trahealnih otvora (stigmata) iz kojih izlaze cjevaste strukture (peritremae), za koje se pretpostavlja da imaju ulogu u disanju. Na ventralnoj strani opisthosome još se mogu uočiti grube čekinje, zadebljale pri korijenu. Postoji izražen spolni dimorfizam. Osim već gore navedenog da su ženke ponešto veće od mužjaka, postoji još pokazatelj za razlikovanje ženki od mužjaka. Mužjaci imaju više hitina u kutikuli i izraženiji leđni štiti. Mužjakove helicere posjeduju mobilan, filiforman spermadaktil koji ima ulogu u razmnožavanju. Postoje i razlike u građi spermadaktila kod mužjaka. Spermadaktil kod *T. mercedesae* i *T. clareae* je dugačak s većim brojem namotaja na distalnom kraju dok je kod mužjaka *T. koenigerum* kratak i završava petljom u obliku svinjskog repa (BAKER i sur., 2005.). Još jedan pokazatelj u razlikovanju mužjaka od ženki je genitalna ploča (epigynium), koja je u mužjaka kraća, nego u ženki i posteriorno oštro završava (ANDERSON i MORGAN, 2007.). Za razliku od odraslih grinja, nimfalni stadiji (protonimfe i deutonomife) su manji, nepigmentirani (bijeke boje) i imaju tri para nogu s tim da je prvi par nogu duži od drugog i trećeg para.



Slika 3. *Tropilaelaps mercedesae*, ženka, ventralna strana (Pest And Diseases Image Library, [www.bugwood.org](http://www.bugwood.org), 2018.).



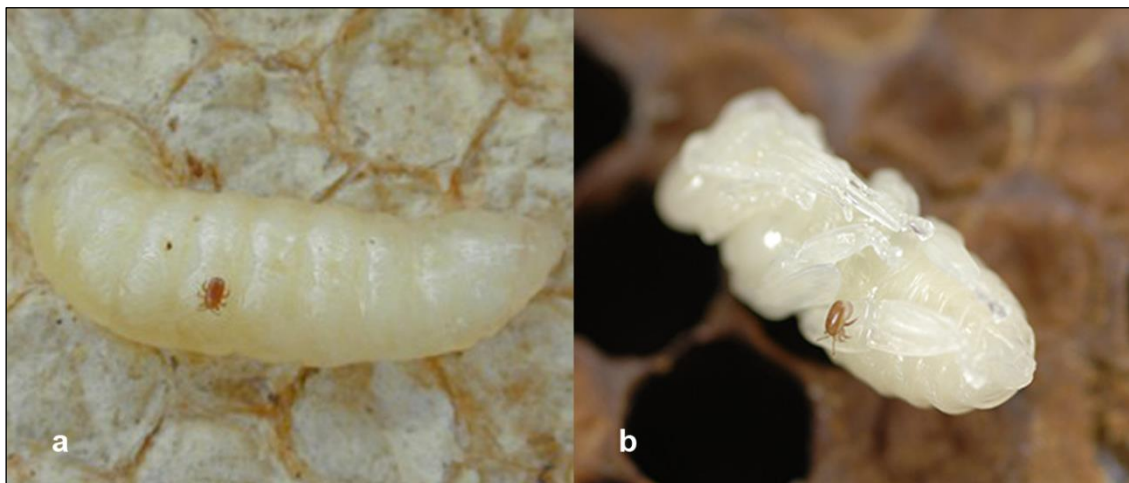
Slika 4. *Tropilaelaps clareae*, ventralna strana (OIE, 2017.).

#### 2.2.2. Životni ciklus grinja

Veliki dio životnog ciklusa se odvija ispod voštanih poklopca u stanicama saća uz pčelinju ličinku (poklopljeno pčelinje leglo). Zrela ženka nakon parenja ulazi u stanice saća radilačkog ili trutovskog legla, koje su u stadiju poklapanja voštanim poklopcem (BURGETT i sur., 1983.; RITTER i SCHNEIDER-RITTER, 1986.). Istraživanja su pokazala da *Tropilaelaps* spp. grinje ne pokazuju posebni afinitet niti prema radilačkom niti prema trutovskom leglu, odnosno stopa invazije u oba legla je podjednaka (WAGHCHOURE-CAMPHOR i MARTIN, 2009.). Dobiveni su i drugačiji rezultati gdje je stopa invazije radilačkog legla bila veća, nego kod trutovskog legla (PETTIS i sur., 2013.). Za razliku od *Tropilaelaps* spp. grinja, *Varroa* spp. grinje preferiraju trutovsko leglo. Otprilike 48 sati nakon poklapanja legla, ženka počinje polagati jedno do četiri jajašca u razmaku od jednog dana. Nakon 12 sati iz jajašca se razvije nimfa, koja prolazi kroz nekoliko stadija (protonimfa i deutonimfa) prije nego što postane odrasla jedinka. Svi razvojni stadiji ovih grinja (nimfe i odrasli primjerci) hrane se hemolimfom pčelinjih ličinki i kukuljica. Razvoj *Tropilaelaps* spp. grinja traje približno sedam dana. Potpuno razvijena pčela napušta stanicu saća na način da pregrize voštani poklopac. S njom istovremeno izlazi „majka“ grinja zajedno sa svojim potomstvom i tada se završava reproduktivna faza *Tropilaelaps* spp. grinja. Obično jedan mužjak i nekoliko ženki napuštaju stanicu saća i pritom traže nove nosioce.



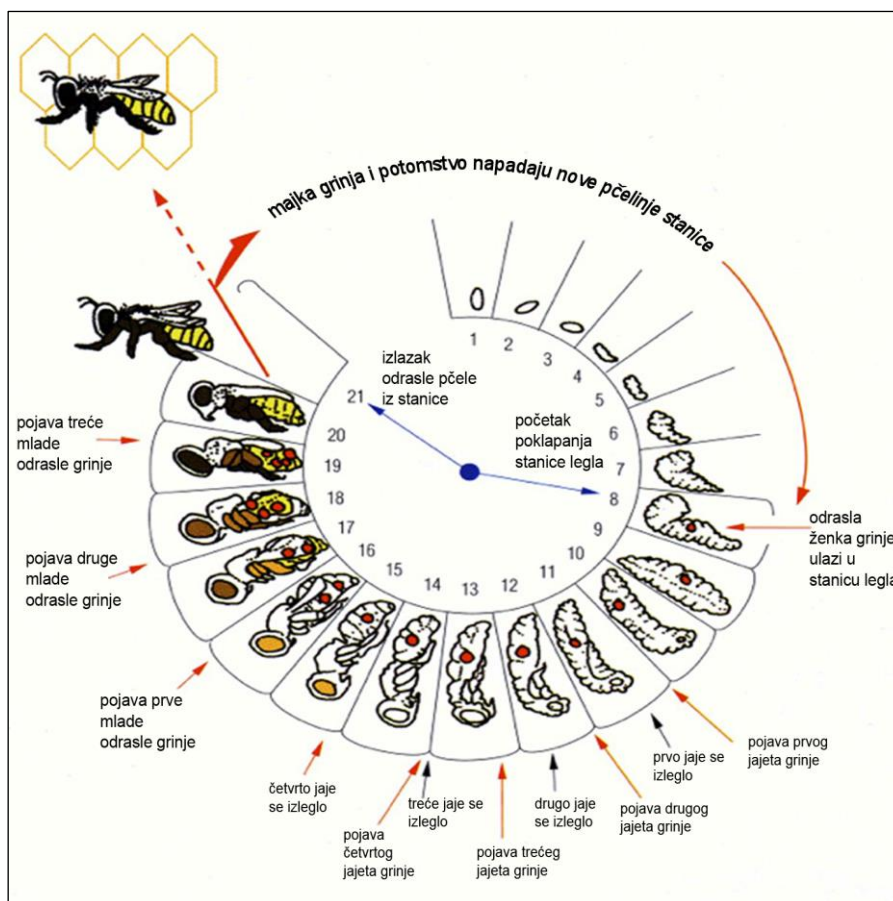
Unutar samo jedne stanice saća zabilježeno je i do deset nimfi i četrnaest odraslih grinja. Nakon toga oslobođene grinje ulaze u kratku foretsku fazu, u kojoj se kreću po saćama i pare. Do te spoznaje se došlo u laboratorijskim uvjetima promatrajući muške i ženske grinje, koje su tek izašle iz stanice legla (WOYKE, 1994.). Prije nego što započnu novu reproduktivnu fazu neko vrijeme provode na odraslim pčelama.



Slika 5. *Tropilaelaps* spp. grinja, pričvršćena na pčelinjoj ličinci (a), na pčelinjoj kukuljici (b) (ANDERSON i ROBERTS, 2013.).



Slika 6. Obitelj grinja *Tropilaelaps mercedesae* s „majkom“ grinjom (svijetlo-smeđe boje) i različitim razvojnim nimfalnim stadijima potomstva (bijeke boje) (ANDERSON i ROBERTS, 2013.).



Slika 7. Životni ciklus *Tropilaelaps mercedesae* na europskoj medonosnoj pčeli (ANDERSON i ROBERTS, 2013.).

Postoje velike sličnosti u razvojnem ciklusu *Tropilaelaps* spp. grinja sa *Varroa* spp. grinjama, no bitno je istaknuti glavne razlike. *Varroa* spp. grinje se hrane i na odraslim pčelama i na pčelinjem leglu. *Tropilaelaps* spp. grinje se mogu hraniti samo na pčelinjem leglu iz razloga što imaju male usne dijelove i nisu u stanju probušiti kožu odrasle pčele, te su u potpunosti ovisne o pčelinjem leglu kao izvoru hrane. Rezultat toga je što njihova foretska faza (nereproduktivna transportna faza) traje samo jedan do dva dana, dok *Varroa* spp. grinje mogu mjesecima preživjeti na odraslim pčelama. Kraći životni ciklus, viša stopa razmnožavanja kao i kratka foretska faza, objašnjavaju zašto se populacija *Tropilaelaps* spp. grinja povećava brže nego kod *Varroa* spp. grinja. U slučaju prisutnosti obje vrste grinja (*T. clareae* i *V. destructor*) u istoj pčelinjoj zajednici, *T. clareae* brojčano značajno prednjači (BURGETT i sur., 1983.; RITTER i SCHNEIDER-RITTER, 1988.). Brojnost populacije *Tropilaelaps* spp. grinja raste puno brže i to u omjeru 25:1 (DEFRA, 2005.) Zabilježeno je i da kad su obje vrste grinja prisutne u istoj stanici saća uz pčelinje leglo, smanjuje se reproduksijska snaga kod obje (RATH i sur., 1995.).



### 2.2.3. Metoda proučavanja razvoja grinja na europskoj medonosnoj pčeli

Kako bi se proučio razvojni ciklus *Tropilaelaps* spp. grinja u zajednici *A. mellifera*, potrebno je izabrati pčelinju zajednicu koja je jako invadirana. Metoda se provodi u slijedećim koracima:

- a) potrebno je otklopiti 300 poklopljenih stanica saća i odrediti koliko stanica sadrži grinje;
- b) izabire se pčelinja zajednica koja ima najveću razinu invazije i nju se koristi za daljnja istraživanja;
- c) iz sredine košnice potrebno je ukloniti dva okvira saća sa leglom i zamijeniti ih sa dva okvira saća s leglom iz zdrave pčelinje zajednice neposredno pred poklapanje;
- d) nakon što su oba okvira s leglom poklopljena, u laboratoriju treba otklopiti stanice s leglom i odrediti broj odraslih grinja, nimfalnih stadija i jaja unutar svake pojedinačne stanice.

### 2.2.4. Metoda proučavanja razvoja grinja na azijskoj divovskoj pčeli

Metoda se provodi u slijedećim koracima:

- a) potrebno je pronaći lokalnog „lovca na med“ kako bi se dobio pristup pčelinjem gnijezdu;
- b) ukloniti dio saća, koje sadrži poklopljeno leglo služeći se oštrim nožem;
- d) saće prevesti u laboratorij na pretragu.

### 2.2.5. Metoda proučavanja razvoja grinja za vrijeme parenja

Ponašanje grinja za vrijeme parenja može se proučavati na način da se odrasla ženka i odrasli mužjak stave u Petrijevu zdjelicu ili u staklenu bočicu, u kojoj se nalazi pčelinja ličinka na kojoj će se hraniti ove grinje. Pčelinju ličinku je potrebno stalno zamjenjivati novom kako bi se grinje održale na životu.

### 2.3. Epizootiologija

*Tropilaelaps* spp. grinje su vrlo pokretne i lako se mogu kretati između pčela unutar košnice, ali i da bi se proširile na druge pčelinje zajednice potrebne su im odrasle pčele za transport (foretska faza). Pomoću pčela se mogu proširiti na velike udaljenosti i to putem prirodnog procesa rojenja, grabeža, zalijetanjem, kontaktom odraslih pčela koje pripadaju različitim pčelinjim zajednicama i posjećuju isto cvijeće za vrijeme paše te kad pčele napuštaju košnicu prilikom jakih invazija grinjama. Također se mogu proširiti putem pčelarske opreme i uobičajenih postupaka u pčelarstvu. Glavni i najbrži način širenja je posredstvom pčelara, koji sele košnice na udaljena područja (RITTER i AKRATANAKUL, 2006.).

S povećanjem globalnog tržišta živim medonosnim pčelama raste i mogućnost širenja *Tropilaelaps* spp. grinja izvan Azije, ali unatoč tome, to se zasad nije dogodilo. Vjerojatni razlog tome je što se šalju paketi sa živim pčelama bez pčelinjeg legla (samo odrasle pčele i jedna matica). Obzirom na činjenicu da se *Tropilaelaps* spp. grinje ipak u jednom trenutku svog života pričvrste na odraslu pčelu, postoji mogućnost njihovog širenja izvan Azije.

Poznato je da se *Tropilaelaps* spp. grinje ne mogu hraniti na odraslim pčelama već samo na pčelinjem leglu i da u odsutnosti pčelinjeg legla ne mogu preživjeti dulje od 74 sata (WILDE, 2000.).

Pretpostavlja se da se na Filipinima tropileloza proširila između *A. breviligula* (prirodnog nosioca) i *A. mellifera* zbog grabeži (LAIGO i MORSE, 1969.). Smatra se da će se u nadolazećim godinama povećati temperaturna područja u kojima *A. mellifera* može održavati leglo tijekom cijele godine kao posljedica klimatskih promjena (LE CONTE i NAVAJAS, 2008.). Samo je pitanje vremena kada će se tropileloza proširiti izvan Azije, pa su *Tropilaelaps* spp. grinje prepoznate kao prijetnja svjetskom pčelarstvu (OIE, 2004.).

### 2.4. Klinička slika

Rani znakovi invazije uglavnom prođu nezapaženo, ali porast populacije *Tropilaelaps* spp. grinja ubrzo dovodi do ugibanja pčela i legla u košnici (OIE, 2017.). Opći karakteristični znakovi bolesti su smanjenje brojnosti odraslih pčela unutar pčelinje zajednice i smanjena otpornost pčela prema ostalim bolestima. Ako je pčela invadirana za vrijeme razvoja još u stadiju ličinke ili kukuljice i preživi do stadija odrasle pčele, tada može biti fizički i fiziološki oštećena. Glavni vidljivi simptomi su : mlade odrasle pčele sa stisnutim i deformiranim nogama ili bez nogu, nepravilno izgrađenim krilima, izobličanim zatkom, manjom tjelesnom masom te kraćim životnim vijekom. Ostali znakovi invazije su nepravilno raspoređeno poklopljeno i

nepoklopljeno pčelinje leglo, a u stanicama saća s leglom mogu se uočiti uginule pčelinje ličinke i kukuljice. Rupice na poklopcima stanica saća su rezultat aktivnosti pčela čistačica i njihovih pokušaja da uklone uginule i jako invadirane kukuljice izvan košnice, ali i da izbace mlade deformirane odrasle pčele. Ispred ulaza u košnicu, mogu se uočiti pčele koje pužu što ukazuje na ozbiljnu invaziju grinjama *Tropilaelaps* spp. (ATWAL i GOYAL, 1971.). Kod jake invadiranosti mogu biti gubici i do 50 % pčelinjeg legla uz osjetan miris truleži zbog velike količine raspadnutih pčelinjih ličinki i kukuljica. Ponekad u slučaju jake invadiranosti odrasle pčele prisilno napuštaju košnicu u obliku roja ili dolazi do potpunog propadanja pčelinje zajednice.

Novija istraživanja su pokazala da *Tropilaelaps* spp. grinje invadiraju pčele vrste *A. mellifera* u svim njenim razvojnim stadijima. Najveći broj oštećenja na pojedinim dijelovima kukuljice nalazi se na zatku, te na ticalima odrasle pčele. Na ličinkama nalazi se više ozljeda nego kod jako invadiranih kukuljica. Uočeno je da se stopa invadiranosti i broj ozljeda na pčelama smanjuje napredovanjem razvoja pčela iz stadija ličinke u kukuljicu, što se može pripisati dostupnosti hranjivim tvarima, higijenskom ponašanju pčela i drugim zasad nepoznatim obrambenim mehanizmima (pozitivna korelacija). Stopa invazije i broj ozljeda po odraslim primjercima pčela su u negativnoj korelaciji sa veličinom pčelinje zajednice u košnici (LING i sur., 2023.).



Slika 8. Štete prouzročene sa grinjama *Tropilaelaps mercedesae* na leglu europske medonosne pčele (*Apis mellifera*) (ANDERSON i ROBERTS, 2013.).

#### 2.4.1. Patogenost *Tropilaelaps* spp. grinja i njihova povezanost s pčelinjim virusima

Vrsta *T. mercedesae* može invadirati i do 90 % pčelinjeg legla zajednice europske medonosne pčele (KIPRASERT, 1984.), dok je puno manja jačina invadiranosti zajednica azijske divovske pčele i to svega od tri do šest posto (UNDERWOOD, 1986.). Shodno navedenom azijske vrste pčela (*A. dorsata* i *A. cerana*) pokazuju puno veću otpornost u usporedbi s pčelama radilicama europske medonosne pčele (KHONGPHINITBUNJONG i sur., 2012.). Pretpostavlja se da je ta razlika u otpornosti na *Tropilaelaps* spp. grinje između pojedinih vrsta pčela vezana uz njihov vrsno specifični odgovor. Radilice vrste *A. mellifera* otvaraju stanice s invadiranim pčelinjim leglom i izbacuju ga izvan košnice dok radilice vrste *A. dorsata* zapečate stanice s invadiranim leglom i na taj način onemogućuju „majci“ grinji i njezinom potomstvu da izađu iz stanice saća i invadiraju nove stanice legla, odnosno da polažu jajašca (WOYKE i sur., 2004.). Rezistencija azijskih vrsta pčela se objašnjava njihovom velikom sposobnošću samočišćenja (higijenskog ponašanja). Iako i vrsta *A. mellifera* ima sposobnost higijenskog čišćenja, *A. cerana* je znatno uspješnija u uništavanju legla zaraženog s vrstom *T. mercedesae* (SHRESTHA i sur., 2020.). One redovito uklanjaju nametničke grinje iz legla, pa se na podnici košnice mogu uočiti oštećene grinje bez nogu. Kod pčelinje vrste *A. cerana*, *Tropilaelaps* spp. grinje gotovo nikad ne izazivaju vidljive značajne promjene na pčelama, kao ni na njihovom leglu. Kod pčelinje vrste *A. dorsata*, ove grinje ne nanose velike gubitke iz razloga što se ova vrsta pčela stalno seli i nakon selidbe ne razvija odmah leglo. To je predugo razdoblje bez prisustva legla i grinje ne mogu tako dugo preživjeti samo na odraslim pčelama (KHONGPHINITBUNJONG i sur., 2012.). Najveći gubici su zabilježeni kod europske medonosne pčele (WONGSIRI i sur., 1989.). Jaka invadiranost pčelinjeg legla vrste *A. mellifera* rezultira izlaskom mladih odraslih pčela s izobličanim krilima, skraćenim zatkom (DE JONG i sur., 1982.; BURGETT i sur., 1983.) te smanjenom tjelesnom težinom (KIPRASERT, 1984.). U slučaju neliječene jako invadirane pčelinje zajednice, dolazi do njenog potpunog propadanja (RITTER, 1988.).

Invadiranost grinjama iz roda *Tropilaelaps* ima velik značaj i iz aspekta mogućeg prenošenja nekih uzročnika virusnih bolesti pčela. S obzirom da je dokazano da *V. destructor* može biti mehanički i biološki prijenosnik različitih pčelinjih virusa, isto se pretpostavilo i za *Tropilaelaps* spp. grinje. U jednom istraživanju provedenom u Kini (DAINAT i sur., 2009.) primjenom molekularnih metoda ispitivano je prisustvo pčelinjih virusa kod pčela radilica europske medonosne pčele iz tri različite pčelinje zajednice i usporedno kod grinja *T. mercedesae*. Ispitivanjima su bili obuhvaćeni: virus izobličanih krila (DWV), virus mješinastog legla (SBV), kašmirski pčelinji virus (KBV), virus crnih matičnjaka (BQCV), virus akutne

paralize pčela (ABPV) i virus kronične paralize pčela (CBPV). U pretraženim uzorcima dokazano je prisustvo genoma virusa izobličenih krila (DWV) u visokom titru, pri čemu je titar virusa izobličenih krila bio viši kod *T. mercedesae* nego kod pčela radilica *A. mellifera*. Ovo je ujedno bio i prvi dokaz prisutnosti pčelinjeg virusa kod grinje *T. mercedesae* (FORSGREN i sur., 2009.).



Slika 9. Prikaz deformiranih primjeraka mladih pčela s ili bez nogu, s vidljivo nepravilno građenim krilima ili bez njih, te skraćenim zatkom (BEEAWARE; Copyright FERA, 2018.).

## 2.5. Dijagnostika tropileloze

Dijagnosticiranje tropileloze je moguće provesti u terenskim uvjetima i konačno potvrditi morfološkom identifikacijom u laboratoriju. Terenska dijagnostika se temelji na pregledu pčelinje zajednice i legla, prikupljanju sumnjivih grinja s odraslih pčela i tijekom pregleda otpadaka na podnici košnice na ljepljivoj podlozi. Rana dijagnostika se postavlja otklapanjem poklopljenog pčelinjeg legla i pronalaskom razvojnih stadija i odraslih grinja. Vrlo je učinkovito dijagnostičko tretiranje pomoću akaricida, koji uzrokuju pad grinja s odraslih pčela i sa saća na ljepljivu podlogu (npr. bijeli karton premazan vazelinom). Konačna dijagnoza se postavlja u laboratoriju pomoću metoda morfološke identifikacije, mikroskopske pretrage i primjenom molekularnih metoda. Serološki testovi nisu uporabljivi niti je dostupno cjepivo.

### 2.5.1. Terenska dijagnostika na pčelinjaku

Prvi znak invazije *Tropilaelaps* spp. grinjama je pojava malenih (< 1 mm) izduženih crveno-smeđih grinja čiji je prvi par nogu postavljen prema naprijed i podsjeća na ticala. Sumnjive grinje mogu se vidjeti tijekom kretanja po površini saća invadiranih pčelinjih zajednica. Izgled njihovog tijela prilično je drugačiji nego onaj kod *Varroa* spp. grinja što se lako može uočiti pomoću povećala. Tijelo *Tropilaelaps* spp. grinja je duže nego šire i jako brzo se kreću. U svakom slučaju tijelo mužjaka je značajnije manje nego kod ženki (ANDERSON i MORGAN, 2007.).

Prilikom monitoringa pčelinjih zajednica na prisutnost tropileloze, pregled pčelinjeg radilačkog i trutovskog legla može omogućiti rano postavljanje sumnje. Odrasle grinje je najlakše pronaći unutar poklopljenog radilačkog i trutovskog legla invadiranih pčelinjih zajednica, gdje se razmnožavaju. Poklopljeno leglo je ujedno i jedino mjesto gdje se mogu naći razvojni stadiji protonimfe i deutonimfe. Nimfe su bijele boje, nepokretne za vrijeme hranjenja na pčelinjim ličinkama / kukuljicama dok su njihovi usni dijelovi i prednje noge pričvršćeni za kutikulu nosioca (RITTER i SCHNEIDER-RITTER, 1988.).

Kako bi se pronašla „majka“ grinja i njezino potomstvo, potrebno je otklopiti pčelinje leglo pomoću pčelarske vilice i izvaditi ličinke i kukuljice. Nakon toga je potrebno nakositi saće kako bi svjetlost izravno obasjala stanicu saća. Ukoliko ima prisutnih grinja u stanici saća, bit će vidljive golim okom na dnu stanice ili na stjenkama stanica saća. Prisutnost odraslih grinja s potomstvom unutar poklopljenog pčelinjeg legla je očiti dokaz da su se grinje razmnožile. Mužjake je najlakše pronaći unutar stanica saća sa pčelinjim leglom i to u trenutku kad se mlada odrasla pčela sprema izaći ili nasumičnim skupljanjem sumnjivih odraslih grinja

za vrijeme njihovog kretanja po površini saća. Kada se saće s leglom izvadi na dnevno svjetlo, grinje koje su bile na površini saća brzo uđu u stanice saća s nepoklopljenim leglom gdje se pričvrste za stjenke stanica saća. Odrasli primjerci grinje i to oba spola, mogu se pronaći i na odraslim pčelama, ali rijetko. Razlog tome je vjerojatno zato što se grinje ne mogu hraniti na odraslim pčelama (WILDE, 2000.), ali koristi odraslu pčelu sa ciljem širenja na druge pčelinje zajednice.

#### 2.5.1.1. Prikupljanje sumnjivih grinja iz pčelinjeg legla

Grinje koje se kreću po površini saća je teško prikupiti pomoću pincete već je najbolje koristiti kist namočen u med, vodu ili alkohol ili se mogu prikupiti malim usnim aspiratorom. Kad je potrebno prikupiti veći uzorak grinja, tada ih je najbolje prikupiti iz stanica saća s poklopljenim pčelinjim leglom. Ovo se može napraviti na terenu, ali ako se prikupljaju uzorci iz više pčelinjih zajednica, tada je brže uzeti saće s poklopljenim leglom, koje će se kasnije pregledati u laboratoriju. Po dostavi saća u laboratoriju se jednim potezom otklapaju voštani poklopci s većeg broja stanica saća poklopljenog pčelinjeg legla iz kojih se zatim uklanja pčelinje leglo. Saće se zatim preokrene iznad bijelog papira te se lupne po gornjoj površini saća kako bi grinje pale na papir. Prikupljene grinje stavlja se u bočice s 70%-tnim etanolom (DIETEMANN i sur., 2013.).



Slika 10. Otklapanje pčelinjeg legla pomoću pčelarske vilice (DEFRA, 2005.).

Jačina invazije se može procijeniti otvaranjem točno određenog broja stanica saća s pčelinjim ličinkama, a razina invazije se računa kao postotak poklopljenih ličinki koje sadrže

žive grinje (BURGETT i KITPRASERT, 1990.). Opisana je brza i jednostavna metoda koju se može primijeniti prilikom uobičajenog pregleda pčelinje zajednice, daje brz uvid u razinu invazije, grinje prikupljene u etanolu moguće je testirati u laboratoriju različitim testovima primjerice morfološkom identifikacijom ili DNA analizama. Međutim, ovom metodom se teže mogu uočiti slabije invazije. Bitno je naglasiti da grinje, koje će služiti za proučavanje ponašanja (bihevioralnih osobina) ne smiju biti usmrćene u etanolu. Zato je za ovakve vrste istraživanja potrebno imati žive grinje, koje je najbolje prikupiti iz tek netom poklopljenog pčelinjeg legla, koje sadrži kasni ličinački ili predkukuljični razvojni stadij. Ove grinje se mogu pohraniti žive u staklenoj bočici ili Petrijevoj zdjelici zajedno s pčelinjom ličinkom, koja će im poslužiti kao izvor hrane.

#### 2.5.1.2. Prikupljanje sumnjivih grinja s odraslih pčela

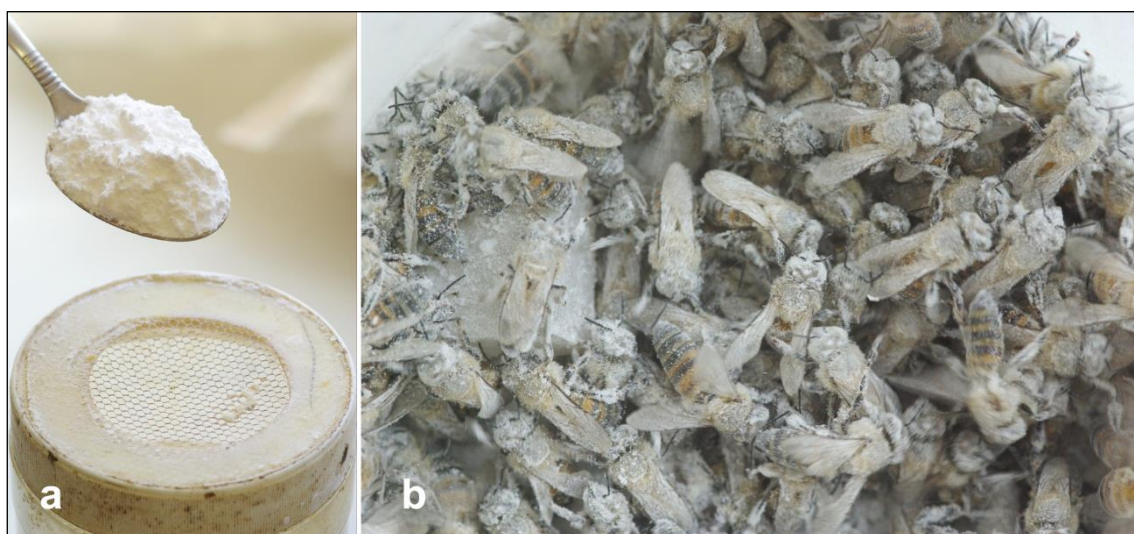
Postoji više metoda pomoću kojih se sumnjive grinje mogu prikupiti s uzorka odraslih pčela. Metode uključuju obradu uzorka odraslih pčela s 70%-tnim etanolom, toplom sapunicom, eterom ili šećerom u prahu.

Primjerice, metoda ispiranja toplom sapunicom i/ili 70%-tnim etanolom podrazumijeva da se uzorak od približno 300 odraslih pčela stavi u staklenku sa širokim grlom i poklopcem te se preko toga izlije topla sapunica ili etanol. Zatim se staklenku dobro začepi i miješa na magnetskoj miješalici 20 do 30 minuta kako bi se grinje odvojile od pčela. Sadržaj staklenke je onda potrebno procijediti kroz prvo sito (okanca promjera 3 do 4 mm) kako bi se prikupile pčele. Ispod prvog sita treba postaviti drugo sito (okanca promjera < 0,5 mm) kako bi prikupili grinje. Pri tome, odrasle pčele i grinje se višekratno ispiru velikom količinom tople vode, a volumen vode za ispiranje i trajanje ispiranja trebaju biti standardizirani (DIETEMANN i sur., 2013.). Na kraju je potrebno prebrojati pčele u uzorku i broj izdvojenih grinja na drugom situ. Zatim se broj grinja podijeli s brojem pčela u uzorku i tako dobiveni broj se pomnoži sa 100 kako bi se utvrdilo koliki je broj grinja na 100 pčela (tzv. stupanj invadiranosti).

Opisana je brza i jednostavna metoda za traženje grinja na odraslim pčelama bilo koje pčelinje zajednice. Ipak, pčele moraju biti jako invadirane grinjama kako bi ova metoda bila uspješna. Kako bi se povećale šanse za prikupljanjem grinja iz uzorka odraslih pčela, mogu se prikupiti i okviri s poklopljenim pčelinjim leglom, s ciljem prikupljanja grinja na samom izlasku iz stanice zajedno s mladim pčelama.



Metoda primjene šećera u prahu podrazumijeva stavljanje približno 300 odraslih pčela u staklenku sa širokim grlom, kojoj se na vrhu nalazi mrežasti i puni poklopac. Kroz mrežicu staklenke se stavi jedna do dvije jušne žlica šećera u prahu. Zatim se staklenku protrese kako bi sve pčele bile prekrivene šećerom u prahu, ostavi se tako kroz jednu minutu pa se staklenku okrene naopačke iznad bijele podloge i nakon skidanja punog poklopca prosijava otprilike jednu minutu. Ukoliko ima grinja na pčelama, one će pasti kroz mrežicu zajedno sa šećerom u prahu na bijelu podlogu za prebrojavanje. Nakon toga se prikupljene otpale grinje ispiru otopinom fosfatnog pufera kako bi ih se ispralo od šećera te osuše (DIETEMANN i sur., 2013.). Na kraju je potrebno prebrojati pčele i grinje te se broj grinja podijeli s brojem pčela u uzorku i dobiveni broj se pomnoži sa 100 kako bi se utvrdilo koliki je broj grinja na 100 pčela. Opisana je brza metoda koja omogućava prikupljanje nekoliko stotina grinja u kratkom razdoblju. Pčele radilice se žive ponovno mogu vratiti u svoju zajednicu te je ekološki prihvatljiva metoda niske cijene. Nedostatak metode je skraćeni životni vijek grinja (MACEDO i sur., 2002.) što može biti problem ako ih treba koristiti u istraživanjima koja traju dulje od tri dana.



Slika 11. Izdvajanje sumnjivih grinja primjenom metode šećera u prahu (a i b) (DIETEMANN i sur., 2013.).

### 2.5.1.3. Pregled na ljepljivoj podlozi

Precizno dijagnostičko pretraživanje se može odraditi uporabom ljepljive podloge pokrivena mrežicom, koja se stavlja na podnicu košnice, tzv. antivaroozna podnica. Mrežica mora imati dovoljno veliki promjer okanaca (oko 3 mm), kroz koje će ispasti otpale grinje, a ujedno će i spriječiti ponovni kontakt pčela s otpalim grinjama. Ljepljiva podloga se može napraviti od kartona ili drugog čvrstog papira, a treba ju premazati vazelinom ili nekim drugim

ljepljivim sredstvom (KOENIGER i sur., 2002.; OSTIGUY i SAMMATARO, 2000.; SAMMATARO i sur., 2000.). Podlogu treba izrezati tako da pristaje dnu podnice u košnici kao i pripadajuću mrežicu. Ljepljivu podlogu treba ostaviti u pčelinjoj zajednici od pet do sedam dana i nakon toga pregledati otpatke s podnice košnice na prisutnost grinja (tzv. prirodni pad grinja). U slučaju da ima puno otpadaka na podnici (česta pojava nakon zimskog razdoblja), grinje će biti teško uočljive pa se preporuča pomiješati otpatke s podnice zajedno s metanolom u velikom spremniku. Većina uginulih grinja će isplivati na površinu dok će čestice voska i propolisa potonuti na dno. Za postavljanje brže dijagnoze treba staviti u dimilicu 25 g duhana i nadimiti pčele. U košnicu treba upuhati dim šest do deset puta i zatvoriti košnicu na 10 do 20 minuta. Nakon 10 minuta treba izvaditi ljepljivu podlogu i prebrojati grinje. Mogu se koristiti i akaricidi, koji uzrokuju pad grinja s odraslih pčela i sa saća, koje će potom pasti na ljepljivu podlogu (dijagnostičko tretiranje). U slučaju primjene akaricida, podnicu treba pregledati i očistiti već 24 sata nakon primjene. Opisana je vrlo osjetljiva metoda, kojom je moguće utvrditi već svega nekoliko grinja, može dati dobar uvid u razinu invazije, pčelinja zajednica nije uznemiravana, a kod primjene akaricida ujedno je poduzeto i kontroliranje bolesti.



Slika 12. Pregled podloške s podnice košnice na prisutnost grinja (APHA, 2015.).



Slika 13. Ljepljiva podloška podnice prekrivena ostacima iz košnice (APHA, 2015.).

Važno je naglasiti da su se prethodno navedene metode terenske dijagnostike: otklapanje radilačkog i trutovskog legla, metoda trešnje okvira saća s otklopljenim leglom, metode ispranja sa sapunicom, etanolom, metoda sa šećerom u prahu te metoda prirodnog pada grinja na ljepljivu podlošku s podnice košnice pokazale vrlo osjetljivima, ali i da sve imaju određene nedostatke, odnosno da su teže izvedive prilikom nadzora velikog broja pčelinjaka na tropilelozu. Što se tiče otklapanja radilačkog i trutovskog pčelinjeg legla, zamjerka je što se tom metodom žrtvuje leglo nakon što se izvadi iz stanica. Razlozi zbog kojih je pregled na ljepljivoj podlozi s podnice košnice nepraktičan su: potrebno razlikovati otpatke od grinja i potrebno vrijeme pretraživanja (OSTIGUY i SAMMATARO, 2000). Za razliku od navedenih metoda, metoda trešnjom otklopljenih saća s leglom se pokazala brzom i jednostavnom dijagnostičkom metodom primjenjivom za pregled velikog broja pčelinjaka (PETTIS i sur., 2013.). Prilikom njezinog izvođenja potrebno je uzeti saće s poklopljenim leglom i otresti odrasle pčele s površine saća. Izvode se ukupno četiri udarca po okviru iznad bijele metalne posude za prikupljanje grinja. Prvo se čvrsto udari po jednom kraju okvira, okrene se pa se udari po drugoj strani i ponovi postupak. Ova metoda se pokazala jednostavnom za izvođenje, skraćuje vrijeme, koje je potrebno provesti u svakom pojedinačnom pčelinjaku i minimalizira oštećivanje pčelinjeg legla. S obzirom na osjetljivost ove metode, predlaže se pregled uzorka veličine od sedam pčelinjih zajednica po pčelinjaku (neovisno o veličini pčelinjaka) i nasumični pregled 312 pčelinjaka unutar regije kako bi se sa 95 %-tnom sigurnošću mogla utvrditi rana invazija s *Tropilaelaps* spp. grinjama (PETTIS i sur., 2013.).

Osim toga pojava raštrkanog legla može isto biti dobar pokazatelj tropileloze. Jača invadiranost u nepravilnom poklopljenom i nepoklopljenom leglu ukazuju na to da će metoda trešnjom imati veću osjetljivost nad onim okvirima s leglom koji imaju bar jednu nepoklopljenu stanicu (PETTIS i sur., 2013.).

## 2.5.2. Laboratorijska dijagnostika

Brza i pouzdana dijagnostika je ključna kako bi se spriječilo širenje tropileloze na nova područja. U slučaju da se na terenu postavi sumnja na tropilelozu, sumnjive primjerke grinja za koje se pretpostavlja da pripadaju rodu *Tropilaelaps*, treba poslati u službeni laboratorij na pretraživanje. Primarna dijagnostička metoda je morfološka identifikacija. Ta metoda je brza i jeftina, a zasniva se na mikroskopskom pretraživanju. Za konačnu potvrdu mora se koristiti neka molekularna metoda.

### 2.5.2.1. Morfološka identifikacija sumnjivih grinja

Morfološka identifikacija se zasniva na vizualnom pregledu uglavnom odraslih primjeraka grinja. Treba uzeti u obzir da se unutar pčelinjih zajednica mogu naći i grinje iz drugih rodova (najčešće vrsta *V. destructor*). Zato treba usporediti morfološke karakteristike pojedinih rodova grinja.

Postupak morfološke metode se izvodi na način da se svi prikupljeni primjerci grinja stave u posudu i provjerava se homogenost uzorka pomoću stereomikroskopa. Ako uzorci nisu homogeni, tada se svaki treba pregledati zasebno. Za mikroskopski pregled meka tkiva moraju biti odstranjena, kako bi se mogle uočiti morfološke karakteristike. Na predmetno stakalce stavi se par kapi mliječne kiseline i na to odabrani primjerci grinja pomoću iglodržaća ili fino preciznih pinceta. Primjerke grinja treba staviti tako da su svojom ventralnom stranom okrenuti prema gore i na to staviti pokrovnicu, pazeći da se pritom ne oštete grinje i da se ne formiraju mjehurići zraka. Ako je moguće treba pažljivo pritisnuti pokrovnicu kako bi se noge grinje širom otvorile. Ponekad pomaže sakupljene primjerke grinja, koji su namijenjeni za morfološku identifikaciju, staviti prvo u vruću vodu, a potom u etanol. To naime pomaže u opuštanju unutrašnjih tjelesnih tkiva i u ukazivanju organa, koje je inače teško uočiti, primjerice helicere. Predmetno stakalce se dalje stavlja na električno kuhalo pri temperaturi od 50 °C u trajanju od pola sata. Za to vrijeme će se ostvariti djelovanje mliječne kiseline. Tako pripremljeni preparati se dalje pregledavaju pod mikroskopom pri povećanju od 100 puta, 200 puta i 400 puta, kako bi se u potpunosti proučili različiti dijagnostički pokazatelji.

Mogu se napraviti i trajni mikroskopski preparati grinja u Hoyerovom mediju, pustiti da se osuše kroz dva tjedna na temperaturi od 50 °C i nakon toga se pokriju pokrovnicom i premažu bezbojnim lakom za nokte kako bi se zapečatili.

Pokazatelji za morfološko raspoznavanje grinja iz roda *Tropilaelaps*

Morfološki pokazatelji za raspoznavanje grinja iz roda *Tropilaelaps* (SMILEY, 1991.; EURL, 2013):

- a) *Tropilaelaps* spp. grinja ima četiri para nogu, prvi par nogu je okomito položen i podsjeća na ticalo → Razred Arachnida
- b) tijelo je nesegmentirano, nastalo spajanjem prosome (prsišta) i opistosome (zatka). → Podrazred Acari
- c) tijelo je veće dužine od širine (omjer dužine i širine je 1,3)
- d) ima jedan par latero-ventralnih otvora (stigmate) između kukova trećeg i četvrtog para nogu → Red Parasitiformes
- e) prisutnost izduženih peritrema i prisutnost tritosternuma (uvjetni pokazatelj) → Podred Mesostigmata
- f) izdužena genitalna ploča (epigynium), posteriorno zaobljena ili oštra, trokutasta analna ploča → Porodica Laelapidae
- g) izdužena genitalna ploča, najmanje dva puta duža od analne ploče
- h) retikularna (mrežasta) sternalna ploča
- i) na opistosomi se nalaze grube čekinje, zadebljale pri korijenu, smještene na apikalnoj polovici s ventralne strane tijela

Prva tri primarna pokazatelja u identifikaciji *Tropilaelaps* spp., provjeravaju se primjenom stereomikroskopa. Ako nisu zadovoljena prva tri pokazatelja, tada se neće nastaviti daljnja pretraga pod mikroskopom.

U slučaju da se potvrde sve morfološke karakteristike, koje moraju imati odrasle grinje, rezultat se proglašava pozitivnom potvrdom grinja iz roda *Tropilaelaps*. S druge strane, ako nedostaje jedna ili više osnovnih morfoloških karakteristika, rezultat se proglašava negativnim, što znači da pretraživana grinja ne pripada rodu *Tropilaelaps*. U slučaju oštećenog uzorka, ne može se potvrditi prisutnost niti odsutnost morfoloških karakteristika, te se takav rezultat proglašava nedokučivim i za potvrdu se treba upotrijebiti molekularna metoda.

## Kriteriji za identifikaciju *Tropilaelaps* spp. grinja na razini vrste

Samo na temelju morfološke identifikacije je nemoguće sa sigurnošću razlikovati četiri *Tropilaelaps* vrste, jer su one morfološki vrlo slične (ANDERSON i MORGAN, 2007.; TANGJINGJAI i sur., 2003.). Početna točka u identifikaciji trebala bi biti informacija o lokaciji s koje je prikupljen uzorak i nosilac (vrsta pčele). Grinje pronađene na divovskim azijskim pčelama (*A. d. breviligula*) ili na europskim medonosnim pčelama (*A. mellifera*) na Filipinima (osim otoka Palawan) i u Indoneziji (osim otoka Sulawesi) na *A. d. binghami* i *A. mellifera*, najvjerojatnije će pripadati vrsti *T. clareae*. Grinje pronađene na europskim medonosnim pčelama u svim ostalim dijelovima Azije, pripadat će vrsti *T. mercedesae*. Preostale dvije vrste *T. koenigerum* i *T. thaii*, pronađene su kako parazitiraju jedino na domaćim azijskim pčelama *A. d. dorsata* i *A. d. laboriosa*. Mnoge morfološke karakteristike, koje se upotrebljavaju u identifikaciji ovih grinja, kao što su tjelesna dužina, struktura tjelesnih ploča, vrlo su varijabilne unutar roda čak i unutar pripadnika iste vrste. Najkorisnije četiri morfološke karakteristike su: tjelesna dužina, izgled analne ploče, struktura muškog organa za prijenos sperme (spermatodactyl ili spermadactyl) i položaj i oblik zubiju na helicerama ženke.

Najmanja grinja iz roda *Tropilaelaps* je *Tropilaelaps koenigerum*. Ženke su dužine manje od 0,7 mm, a mužjaci su dužine oko 0,57 mm. Ženke *T. mercedesae* su dužine 0,95 do 0,99 mm, a mužjaci 0,90 do 0,92 mm. Ženke *T. clareae* su dužine 0,87 do 0,88 mm, a mužjaci 0,85 do 0,85 mm. Ženke *T. thaii* su dužine 0,89 mm dok za mužjake nije poznato (ANDERSON i ROBERTS, 2013.).

Mušjaci i ženke vrste *T. koenigerum* imaju kruškolik izgled analne ploče, kod ženki *T. thaii* analna ploča nalikuje zvonu. Analne ploče mužjaka i ženki vrste *T. mercedesae* i *T. clareae* vrlo su varijabilne u izgledu i ne mogu poslužiti u morfoložkoj identifikaciji vrste (ANDERSON i ROBERTS, 2013.). Mušjaci vrste *T. koenigerum* imaju kratak spermadaktil, koji na svom vrhu završava petljom u obliku svinjskog repa, dok je spermadaktil kod mužjaka vrste *T. mercedesae* i *T. clareae* dugačak s velikim brojem namotaja (ANDERSON i ROBERTS, 2013.).

Ženke vrste *T. koenigerum* imaju samo jedan zub subapikalno na helicerama s karakterističnom brazdom. Ženke vrste *T. mercedesae* i *T. clareae* također imaju subapikalni zub, ali bez brazde (žlijeba). Kod ženki vrste *T. thaii* nema subapikalnog zuba (ANDERSON i ROBERTS, 2013.).



### 2.5.2.2. Molekularne dijagnostičke metode

Po prvi puta molekularna istraživanja grinja iz roda *Tropilaelaps* su izvedena 90-tih godina prošlog stoljeća, u svrhu ispitivanja genetske varijacije između vrsta *T. clareae* i *T. koenigerum* (TANGJINGJAI i sur., 2003.). Ispitivanje genetskih varijacija unutar roda se pokazalo dosta korisno kako u redefiniranju već poznatih vrsta, tako i u opisivanju novih vrsta i novih podvrsta unutar vrsta (ANDERSON i MORGAN, 2007.). S obzirom da je morfološka identifikacija *Tropilaelaps* spp. komplicirana zbog velike sličnosti s drugim grinjama, koje mogu biti prisutne u košnici, nije za čuditi da se konačna dijagnoza postavlja upravo pomoću molekularnih metoda. Glavna molekularna metoda, koja se koristi je lančana reakcija polimerazom (eng. *Polymerase chain reaction*, PCR). Lančana reakcija polimerazom je metoda eksponencijalnog umnažanja fragmenta molekule DNA *in vitro*. Zahvaljujući PCR-u, mogu se dobiti milijuni kopija točno određene sekvence gena, za svega nekoliko sati. Za izvođenje PCR-a, potrebna je izolirana DNA i niz reagensa, koji se nazivaju PCR reakcijska mješavina (eng. PCR master mix). Sastav PCR reakcijske mješavine je slijedeći: DNA matrica, početnice, dNTP (eng. deoxynucleoside triphosphates), DNA polimeraza, MgCl<sub>2</sub> i PCR pufer. DNA matrica je izolirana dvolančana DNA, koja sadrži fragment od interesa, služi kao kalup po kojem se provodi umnažanje i stvaranje amplikona. Ovdje se radi amplifikacija određene sekvence mitohondrijskog gena koji kodira citokrom oksidazu I (COXI) (ANDERSON i MORGAN, 2007.) i cijelih jezgrenih gena (ITS1-5.8S-ITS2).

Početnice su *in vitro* sintetizirani jednolančani oligonukleotidi, dužine 20 do 30 nukleotida, čije su sekvence komplementarne krajevima DNA fragmenta od interesa. F (eng. forward) početnica komplementarna 5' kraju na kraju DNA fragmenta. R (eng. reverse) početnica komplementarna 3' kraju na kraju DNA fragmenta. Početnice COXI-TCF1 i COXI-TCR2 amplificiraju fragment do 538 parova baza. dNTP je smjesa deoksinukleozid trifosfata (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) osnovnih građevnih jedinica DNA. Njihovom polimerizacijom se sintetiziraju amplikoni, tj. umnaža fragment DNA od interesa. DNA polimeraza je enzim s funkcijom sinteze, tj. replikacije DNA. U PCR-u se koristi *Taq* polimeraza, izolirana iz bakterije *Thermus aquaticus*, koja živi u termalnim izvorima i otporna je na visoke temperature i najaktivnija je na temperaturi od 70 °C. Magnezijevi ioni (MgCl<sub>2</sub>) neophodni su za aktivnost DNA polimeraze. PCR pufer je standardni pufer u kojem se odvija PCR, po sastavu blago lužnata vodena otopina soli (pH 8,3 do 8,8). Ekstrakcija DNA se provodi iz tkiva *Tropilaelaps* grinja, koje su prikupljene i očuvane u 70%-tnom etanolu. Može se upotrijebiti bilo koje tkivo u tu svrhu. Slijedeći korak je amplifikacija DNA pretraživanih grinja za čije provođenje je

potreban PCR termoblok i set specifičnih forward i reverse prajmera. Termoblok je programiran na određeni broj ciklusa umnažanja DNA.

Amplifikacija DNA sastoji se od:

- a) Inicijalnog denaturiranja DNA u trajanju od 3 do 5 minuta na temperaturi od 94 °C. Pri tome se razdvajaju spareni lanci DNA, koji će služiti kao kalupi za amplifikaciju;
- b) 35 PCR termo-ciklusa denaturacije kroz 1 minutu na temperaturi od 94 °C;
- c) Hibridizacije početnica na komplementarne odjeljke DNA (eng. annealing). U tom procesu će temperatura biti snižena na prosječno 55 °C kako bi se oligonukleotidne početnice vezale na komplementarne razdvojene lance DNA;
- d) Sinteze komplementarnog lanca (eng. extension) kroz 2 minute na temperaturi od 72 °C, koja je optimalna za djelovanje *Taq* polimeraze. Pri tom će polimeraza ugrađivati nove nukleotide sve dok ne stigne do druge početnice. S obzirom da se sinteza odvija na oba lanca, u jednom ciklusu amplifikacije broj molekula DNA će se udvostručiti. Postupak se može ponavljati u cijelosti i na taj način će broj novonastalih molekula eksponencijalno rasti. Prosječni PCR protokol se odvija u 30 do 40 ciklusa. Nakon 40 ciklusa pojavljuje se fenomen platoa, pri čemu dolazi do zasićenja ili potrošnje reaktanata tako da se izgubi učinkovitost reakcije.
- e) Terminacije kroz 5 minuta na temperaturi od 72 °C.

PCR može dati lažno pozitivne i lažno negativne rezultate ako se ne vodi računa o pravilnom postavljanju, standardizaciji i izvođenju metode. Stoga je neophodno napraviti standardizirane protokole za izvođenje PCR-a. Potrebno je voditi računa o opremanju i postavljanju laboratorija, ispravnosti opreme i reagensa, pravilnom čuvanju reagensa, ispravno biranom sistemu detekcije za PCR proizvode.



Tablica 2. Prikaz slijeda F i R početnica (5'-3') koje se najčešće koriste u istraživanju *Tropilaelaps* spp. grinja, za amplificiranje fragmenta specifičnog gena.

Regija gena	Veličina fragmenta (bp)	Slijed prajmera (5'-3')	Naziv prajmera
COXI	538	(F) CTATCCTCAATTATTGAAATAGGAAC	TCF1
		(R) TAGCGGCTGTGAAATAGGCTCG	TCR2
ITS1-5,8S-ITS2	522-526	(F) GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	ITS5
		(R) TCCTCCGCTTATTGATATGC	ITS4

Detekcija amplificiranih PCR proizvoda se temelji na principu elektroforeze, metodi razdvajanja fragmenata, koja se zasniva na različitoj pokretljivosti fragmenata u električnom polju ovisno o njihovoj molekularnoj masi. Ploča za gel elektroforezu sastoji se od matriksa s jažicama i puferske otopine kroz koju molekule DNA putuju tijekom elektroforeze. Prvo je potrebno pripremiti 1,2%-tni agarozni gel s puferom TAE (tris acetat, EDTA). Uzorci DNA pomiješaju se s bojom za vizualizaciju elektroforeze, te se nanese u jažice pripremljenog gela. Položaj molekula DNA u gelu je vidljiv zahvaljujući interkalaciji etidij bromida između parova baza DNA, koji fluorescira obasjan UV svjetlom valne duljine 312 nm. Interpretacija rezultata se zasniva na prisutnosti ili odsutnosti amplificiranih proizvoda veličine 538 parova baza, uključujući obje početnice. Međutim važno je spomenuti da prisutnost PCR proizvoda odgovarajuće veličine, nije dovoljna u identifikaciji grinja iz roda *Tropilaelaps*, kao niti vrsta unutar roda. Upravo zbog toga potrebno je provesti dodatno sekvencioniranje PCR proizvoda.

Sekvencioniranje DNA je najrašireniji i najprecizniji način identifikacije vrsta. Identifikacija se temelji na izolaciji DNA (mitohondrijske DNA) pomoću PCR-a te sekvencioniranju, tj. određivanju sljedova nukleotida. Dobivena DNA sekvenca se uspoređuje sa ostalim sekvencama s iste regije, koje su pohranjene u banci gena. Istraživanja su pokazala da je dobivena sekvenca sa specifičnih regija mitohondrijske DNA, korisna u ispitivanju varijacija između vrsta i unutar vrsta (DIETEMANN i sur., 2013.). U identifikaciji *Tropilaelaps* spp. grinja na razini vrste, koristi se DNA sekvenca, dobivena od fragmenta od 538 parova baza mitohondrijske DNA COXI gena i cijeli jezgrieni geni ITS1-5.8S-ITS2. Sekvenca COXI je također korisna u traženju genetskih varijacija unutar vrsta. ITS regija ne pokazuje genetsku varijaciju unutar određene vrste, dok COXI sekvenca pokazuje 1 do 4% varijacija unutar vrsta i 11 do 15% između vrsta. Grinje unutar iste vrste, koje pokazuju varijaciju na COXI sekvenci, definirane su kao haplotipovi. Koncept haplogrupa, koji je opisan kod *Varroa* spp. grinja

(DIETEMANN i sur., 2013.) nije još usvojen, jer kod *Tropilaelaps* spp. grinja postoji puno više varijacija na COXI sekvenci (ANDERSON i TRUEMAN, 2000.). S obzirom na činjenicu da se na temelju COXI sekvence grinje mogu determinirati na razini vrste, COXI sekvenca se koristi u filogenetskim istraživanjima.

## 2.6. Diferencijalna dijagnostika

- 1) *Varroa* spp. grinje (*V. destructor* i *V. jacobsoni*) imaju tijelo veće širine od dužine i sporije se kreću (širine oko 1,5 mm, dužine 1 mm), za razliku od njih tijelo *Tropilaelaps* spp. grinja je veće dužine od širine (dužine 0,6 do 1 mm, širine 0,4 do 0,5 mm) i jako brzo se kreću. Simptomi invazije obiju vrsta grinja su slični i nazivaju se sindromom nametničke grinje.
- 2) *Braula coeca* je pčelinja uš crveno smeđe boje. Dužina tijela joj iznosi 1,5 mm, prekrivena je s dlacicama i ima šest dugih nogu, bez krila. Smatra se štetnikom.
- 3) *Mellitiphis alvearius*, peludna grinja svijetlo-smeđe boje, 0,75 mm duga i 0,75 mm široka. Nije štetna ni za pčele ni za pčelinje leglo, ali se može ponekad naći u košnici.



Slika 14. Usporedba *Varroa* spp. (lijevo) sa *Tropilaelaps* spp. (desno) (www.beetography.com, 2018.).



Slika 15. Usporedba jedne ženke *Tropilaelaps mercedesae* (lijevo) s dvije ženke *Varroa jacobsoni* (desno), na ličinci *Apis mellifera* (ANDERSON i ROBERTS, 2013.).



Slika 16. Prikaz različitih vrsta grinja, *Braula coeca* (muha; vrh), *Varroa* spp. (desno), *Tropilaelaps* spp. (dno), peludna grinja (lijevo) (OIE, 2017.)

## 2.7. Kontroliranje tropileloze

Glavni cilj u kontroliranju brojnosti grinja je održavanje njihove populacije ispod razine ekonomske štete. Taj cilj je moguće ostvariti kombinacijom primjene veterinarsko-medicinskih proizvoda (VMP-a), akaricida ili varroacida te biotehnoloških metoda.

### 2.7.1. Akaricidi

Akaricidi su veterinarsko-medicinski proizvodi koji učinkovito ubijaju grinje. Mogu se primijeniti u hrani, izravno na odraslim pčelama putem kontaktnih traka ili isparavanjem. Mnogi sintetski akaricidi, koji se koriste u kontroliranju i liječenju varooze, također su učinkoviti i u liječenju tropileloze (PICHAI i sur., 2008.). Iako trenutno nema posebnih VMP-a odobrenih za kontroliranje tropileloze, u slučaju pojave bolesti, koristila bi se ista sredstva kao i ona za kontrolu varooze (kumafos, flumetrin, timol). Učinci različitih akaricida kao što su aktivne tvari mravlje kiseline, tau fluvalinata ili amitraza, istraživani su u velikom broju istraživanja (ARUN i sur., 2003.; MAHMOOD i sur., 2011.; YU i sur., 2011.; TLAK GAJGER i sur., 2020.). Istraživan je učinak sublimiranog sumpora na *T. clareae* i na *V. destructor*. Rezultati istraživanja su pokazali da su uspješno usmrćene grinje u stanicama saća i u pčelinjem leglu, ali uspjele su preživjeti grinje, koje su bile pričvršćene za odrasle pčele (YU i sur., 2011.). U Honeybee Research Institute u Pakistanu, istraživani su učinci mravlje kiseline i timola. Rezultati su pokazali da je mravlja kiselina uništila značajno veći broj grinja u odnosu na timol (MAHMOOD i sur., 2011.). Prilikom upotrebe akaricida u suzbijanju tropileloze treba biti oprezan, jer neke aktivne tvari mogu biti toksične za pčele. Osim toga nakon tretiranja pčelinjih zajednica akaricidima potrebno je određeno vrijeme prije nego se njihov med smije konzumirati u ljudskoj prehrani (karenca). Upravo se iz tog razloga istražuju eterična ulja različitih biljaka za koje se pokazalo da imaju akaricidnu aktivnost. Testirana su eterična ulja biljaka papra (*Piper betle*), đumbira (*Amomum krervanh*) i tzv. žutog drveta (*Zanthoxylum limonella*) pomoću traka umočenih u eterično ulje u različitim koncentracijama, koje su se svakog tjedna postavljale u košnicu u razdoblju od četiri tjedna. Najveću akaricidnu aktivnost u laboratorijskim ispitivanjima pokazalo je eterično ulje papra. Prednost eteričnih ulja je što su slabo toksična za odrasle pčele. U laboratorijskim uvjetima su pokazala dobru akaricidnu aktivnost, ali u terenskim uvjetima nisu bila toliko učinkovita (CHAIMANEE i sur., 2021.). Proučavane su različite biljke u borbi protiv *T. clareae* u zajednicama *A. mellifera* i to lišće češnjaka, lišće sladića i kurkuma. Lišće češnjaka se pokazalo najučinkovitije i uzrokovalo je ugibanje 63% *Tropilaelaps* spp. grinja u košnici (HOSAMANI i sur., 2007.).

### 2.7.2. Biotehnološke metode

Biotehnološke metode, koje se koriste u područjima gdje je prisutna tropileloza su: zatvaranje matice u kavez, izrezivanje saća i postavljanje okvira građevnjaka. S obzirom na već poznatu činjenicu da se *Tropilaelaps* spp. grinje ne mogu hraniti na odraslim pčelama i na

činjenicu da ne mogu preživjeti bez pčelinjeg legla duže od nekoliko dana jer se hrane hemolimfom pčelinjih ličinki/kukuljica, a ta njihova slabost se koristi u kontroliranju brojnosti njihove populacije. Populacija *Tropilaelaps* spp. grinja se može jako smanjiti ukoliko se osigura dovoljno dugo razdoblje bez pčelinjeg legla u pčelinjoj zajednici i to zatvaranjem matice kroz razdoblje od devet dana te naknadnim uklanjanjem poklopljenog legla. Izrezivanje saća je metoda, koja se temelji na uklanjanju grinja iz poklopljenog pčelinjeg legla. Uglavnom se uklanja trutovsko leglo ili se postavi okvir građevnjak i pusti se da matica zaleže trutovsko leglo. Nakon što je leglo poklopljeno, okvir građevnjak se izvadi, saće s leglom izrežu i pretope u vosak, a okvir građevnjak se ponovno stavi u košnicu. Višestrukim ponavljanjem tog postupka, može se uništiti znatan broj grinja (50 do 70%). Opisana “*comb trapping*“ metoda radilačkog legla zahtijeva privremeno zatvaranje matice na određenom dijelu saća, koji se kasnije uklanja.

## 2.8. Profilaksa

Diljem svijeta su uspostavljeni strogi programi monitoringa kako bi se spriječilo širenje tropileloze izvan Azije. Bilo kakav prijevoz medonosnih pčela iz područja s tropilelozom u slobodno područje mora se provesti na adekvatan način, koji uključuje prijevoz paketnih rojeva. U paketnim rojevima se smiju nalaziti samo odrasle pčele i jedna matica bez prisutnosti saća i pčelinjeg legla. Kada dođu do odredišta, pčele u paketnim rojevima moraju biti smještene daleko od pčelinjih zajednica i to u minimalnom trajanju od dva dana. Nakon dva dana karantene, *Tropilaelaps* grinje, koje su eventualno mogle biti transportirane u paketnom roju (foretske grinje) će uginuti, jer nema pčelinjeg legla na kojem bi se mogle hraniti.

Pčelarima se preporučuje da promatraju svoje pčelinje zajednice na prisutnost sumnjivih grinja kao dio svakodnevne rutine. To je posebno važno u onim pčelinjacima, koji su na područjima visokog rizika. S obzirom da je glavni način širenja tropileloze putem pčelararskih radova i alata, od iznimne važnosti je provoditi dobru pčelarsku praksu i pravilno primjenjivati biosigurnosne mjere.

Nedostatak koevolucije između ektoparazitskih grinja i nosioca europske medonosne pčele smatra se ključnim čimbenikom osjetljivosti pčela (DE JONG i sur., 1982.). Uzimajući u obzir slabu učinkovitost lijekova protiv grinja kao i njihove moguće nuspojave (DIETEMANN i sur., 2012.) napori u uzgoju usmjereni su na odabir pčelinjih zajednica koje se mogu oduprijeti ozbiljnim biotičkim prijetnjama (BÜCHLER i sur., 2010.). Selekcija pčelinjih zajednica na otpornost na biotičke prijetnje važan je oblik ljudske intervencije za ubrzavanje evolucije pčelinjih zajednica i postizanje otpornosti (LIN i sur., 2023.).

Dugotrajnim odabirom *A. mellifera* postigla se djelomična otpornost na grinju *V. destructor*. Istraživanjima je otkriveno da je važna osobina otpornosti na varoozu higijensko ponašanje pčela (SHRESTHA i sur., 2020.). Higijensko ponašanje znači sposobnost pčela da prepoznaju i unište leglo zaraženo grinjama prekidajući na taj način njihovo razmnožavanje. Otkriveno je da su iste pčele čistačice uništavale leglo zaraženo s grinjama *V. destructor* i leglo zaraženo s grinjama *T. mercedesae* što sugerira da je higijensko ponašanje protiv dviju grinja isto svojstvo. Selektivnim uzgojem pčelinjih zajednica na otpornost na varoozu na temelju higijenskog ponašanja, mogla bi se povećati otpornost i na grinje *T. mercedesae* (SHRESTHA i sur., 2020.).

Najnovije informacije govore o širenju tropileloze iz istočnih dijelova Azije prema zapadu te je bolest otkrivena u Uzbekistanu, jugozapadnim dijelovima Rusije i najvjerojatnije u Iranu. S obzirom na ovu prijetnju, hitno je potrebno praćenje situacije u susjednim zemljama kao i uspostava karantene (COLOSS, [coloss.org/articles/4912](http://coloss.org/articles/4912)).



Slika 17. Paketni roj medonosnih pčela, koji sadrži samo odrasle pčele i jednu maticu (entnemdept.ufl.edu/creatures/MISC/BEES/Tropilaelaps.htm, 2018.).

Usklađivanjem hrvatskog zakonodavstva s propisima Europske unije (Uredba 2016/429), donesen je novi Zakon o zdravlju životinja (NN 152/2022) kojim je stavljen izvan snage Pravilnik o mjerama suzbijanja i iskorjenjivanja pčelinjih bolesti (NN 114/2004). Pravilnik je propisivao što treba poduzeti prilikom sumnje na tropilelozu, a što kada se tropileloza potvrdi. Na tropilelozu je sumnjiva pčelinja zajednica u kojoj su kliničkim pregledom utvrđeni znakovi svojstveni toj bolesti. Sve pčelinje zajednice sumnjive na tropilelozu, obavezno podliježu laboratorijskoj pretrazi, koju obavljaju ovlaštene laboratoriji. U

pčelinjaku u kojem je utvrđena tropileloza, nadležni veterinarski inspektor naređuje mjere zabrane selidbe i trgovine pčelama i uništenje svih bolesnih pčelinjih zajednica spaljivanjem i zakapanjem.

Naredba o provedbi i financiranju mjera sprječavanja, kontrole i nadziranja bolesti životinja na području Republike Hrvatske (NN 1/2023), proizlazi iz Zakona o zdravlju životinja (NN 152/2022). U općim odredbama navedeno je da su subjekti i druge relevantne fizičke ili pravne osobe dužne odmah i bez odgađanja prijaviti sumnju na bolest veterinaru dok su dužnosti veterinara da poduzmu sve mjere kako bi spriječili unošenje, razvoj i širenje bolesti te rano otkrivanje bolesti davanjem pravilne dijagnoze i diferencijalne dijagnoze kako bi se isključila ili potvrdila prisutnost bolesti. Veterinari su dužni nakon prijave sumnje na bolest bez odlaganja provesti istraživanje kako bi se bolest potvrdila ili isključila, a koje po potrebi uključuje klinički pregled na reprezentativnom uzorku, uzimanje odgovarajućih uzoraka i laboratorijsko pretraživanje.

## 2.9. Gospodarske štete

S obzirom na činjenicu da grinje iz roda *Tropilaelaps* imaju visoku stopu razmnožavanja i brzi razvoj od jajeta do odrasle jedinke, njihova populacija može brzo narasti. Poznato je da *Tropilaelaps* spp. grinje mogu uzrokovati značajno ugibanje pčelinjeg legla. Kod jakih invazija *Tropilaelaps* spp. grinje mogu ubiti čak i do 50% pčelinjeg legla. Osim toga one pčelinje ličinke / kukuljice, koje su preživjele invaziju za vrijeme svog razvoja razvit će se u odrasle mlade pčele s kraćim životnim vijekom, smanjenom tjelesnom masom, deformiranim krilima i nogama. Nije rijetka ni situacija da pčele napuštaju košnicu i leglo u želji za preživljavanjem. Neliječeni slučajevi invazije uzrokuju ugibanje pčelinje zajednice (ANDERSON i ROBERTS, 2013.). Tropileloza može uzrokovati gubitak 50 do 100% pčelinjih zajednica (HOSAMANI i sur., 2006).

Gospodarske štete manifestiraju se kroz negativan ekonomski učinak, socijalni učinak, učinak na staništa i učinak na bioraznolikost.

Medonosne pčele imaju ogromnu ulogu u poljoprivrednoj proizvodnji i hortikulturi kao oprašivači. Stoga bilo koja bolest, koja dovodi do smanjenja broja pčelinjih zajednica, odrazit će se negativno na poljoprivrednu industriju. Neizravna korist koja se dobiva od pčela oprašivanjem poljoprivrednih kultura premašuje sve ostale ekonomske koristi koje suvremeno pčelarstvo ima kroz proizvodnju meda, voska, peludi, propolisa, matične mliječi, pčelinjeg otrova (DELAPLANE i MAYER, 2000.).

Osim negativnog utjecaja na poljoprivrednu proizvodnju, odnosno proizvodnju hrane za čovjeka i životinje, negativne posljedice pretrpjet će i pčelari. To će se posebno odraziti na proizvodnju meda i drugih pčelinjih proizvoda. Smanjenje broja pčelinjih zajednica kao posljedica tropileloze, negativno će se odraziti u onim staništima gdje je vrlo bitno oprašivanje pčelama, kao i na ukupnu bioraznolikost pčela (CUTHBERTSON i BROWN, 2009.).



### 3. ZAKLJUČAK

Grinje iz roda *Tropilaelaps*, a posebice vrste *T. clareae* i *T. mercedesae*, predstavljaju prijetnju suvremenom pčelarstvu na svjetskoj razini i stoga zahtijevaju nužnu pažnju svjetske istraživačke zajednice. Velika je vjerojatnost da će se *T. mercedesae* proširiti izvan područja Azije, s obzirom da je prisutna po cijeloj kopnenoj Aziji i jugoistočnoj Aziji. *T. clareae* je potvrđena samo na Filipinima. Provedena istraživanja na zajednicama europske medonosne pčele upućuju na zaključak da su navedene dvije vrste *Tropilaelaps* grinja patogene za *A. mellifera* u istoj mjeri kao i *V. destructor*, ako ne i više. Pčelari, koji uzgajaju stotine ili tisuće pčelinjih zajednica, teško će držati tropilelozu pod kontrolom jer si ne mogu priuštiti potrebno razdoblje bez prisustva pčelinjeg legla. Iz svega navedenog važno je naglasiti da bi trebalo težiti tome da se učini sve kako bi se spriječilo širenje tropileloze izvan granica Azije, jer posljedice bi mogle biti katastrofalne po komercijalno pčelarstvo diljem svijeta.

#### 4. LITERATURA

1. ANDERSON, D. L. (1994): Non-reproduction of *Varroa jacobsoni* in *Apis mellifera* colonies in Papua New Guinea and Indonesia. *Apidologie* 25, 412–421.
2. ANDERSON, D. L., M. J. MORGAN (2007): Genetic and morphological variation of bee-parasitic *Tropilaelaps* mites (*Acari: Laelapidae*): new and re-defined species. *Exp. Appl. Acarol.* 43, 1–24.
3. ANDERSON, D. L., J. M. K. ROBERTS (2013): Standard methods for *Tropilaelaps* mites research. *J. Apicultural Res.* 52, 1–16.
4. ANDERSON, D. L., J. W. H. TRUEMAN (2000): *Varroa jacobsoni* is more than one species. *Exp. Appl. Acarol.* 24, 165–189.
5. APHA (2015): *Tropilaelaps* parasitic mites of honey bees. The Animal and Plant Health Agency, UK.
6. ARUN, K., S. K. SHARMA (2003): Evaluation of sulfur application methods against *Tropilaelaps clareae* Delfinado and Baker in *Apis mellifera* colonies. *Uttar Pradesh J. Zool.* 23, 159–160.
7. ATWAL, A. A., N. P. GOYAL (1971): Infestation of honey bee colonies with *Tropilaelaps* and its control. *J. Apicultural Res.* 10, 137–142.
8. BAILEY, L., B. V. (1991): Honey bee pathology. Harcourt Brace Jovanovich, Sidcup.
9. BAKER, A. B., A. HICK, W. CHMIELEWSKI (2005): Aspects of the history and biogeography of the bee mites *Tropilaelaps clareae* and *T. koenigerum*. *J. Apic. Sci.* 49, 13–19.
10. [www.beetography.com](http://www.beetography.com) (12.04.2018).
11. BEEAWARE, [beeaware.org.au](http://beeaware.org.au) (13.03.2018).

12. BURGETT, M. D., P. AKRATANAKUL, R. A. MORSE (1983): *Tropilaelaps clareae*: a parasite of honey bees in South-East Asia. *Bee World* 64, 25–28.
13. BURGETT, M. D., P. A. ROSSIGNOL, C. KITPRASERT (1990): A model of dispersion and regulation of brood mite (*Tropilaelaps clareae*) parasitism of the giant honey bee (*Apis dorsata*). *Can. J. Zool.* 68, 1423–1427.
14. BÜCHLER, R., S. BERG, Y. LE CONTE (2010): Breeding for resistance to *Varroa destructor* in Europe, *Apidologie* 41, 393–408.
15. CHAIMANEE, V., N. WARRIT, T. BOONMEE, J. S. PETTIS (2021): Acaricidal activity of essential oils for the control of honeybee (*Apis mellifera*) mites *Tropilaelaps mercedesae* under laboratory and colony conditions, *Apidologie* 52, 561–575.
16. COLOSS, [coloss.org/articles/4912](https://coloss.org/articles/4912) (21.8.2023).
17. CUTHBERTSON, A. G. S., M. A. BROWN (2009): Issues affecting British honey bee biodiversity and need for conservation of this important ecological component. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 6, 695–699.
18. DAINAT, B., T. KEN, H. BERTHOUD, P. NEUMANN (2009): The ectoparasitic mite *Tropilaelaps mercedesae* (*Acari, Laelapidae*) as a vector of honey bee viruses. *Insectes Sociaux* 56, 40–43.
19. DEFRA (2005): *Tropilaelaps*: parasitic mites of honey bees. Department for Environment, Food and Rural Affairs, London.
20. DE JONG, D., E. W. MORSE, G. C. EICKWORT (1982): Mite pests of honey bees. *Annu. Rev. Entomol.* 27, 229–252.
21. DELAPLANE, K. S., D. F. MAYER (2000): *Crop pollination by bees*. CABI Publishing, Wallingford.

22. DELFINADO, M. D., E. W. BAKER (1961): *Tropilaelaps* a new species of mite from the Philippines (*Laelapidae: Acarina*). Fieldiana Zoology 44, 53–56.
23. DELFINADO-BAKER, M., K. AGGARWAL (1987): Infestations of *Tropilaelaps clareae* and *Varroa jacobsoni* in *Apis mellifera* colonies in Papua New Guinea. Am. Bee J. 127, 443.
24. DELFINADO-BAKER, M. D., E. W. BAKER (1982): A new species of *Tropilaelaps* parasitic of honey bees. Am. Bee J. 122, 416–417.
25. DIETEMANN, V., F. NAZZI, S. J. MARTIN, D. ANDERSON, B. LOCKE, K. S. DELAPLANE, Q. WAUQUIEZ, C. TANNAHILL, E. FREY, B. ZIEGELMANN, P. ROSENKRANZ, J. D. ELLIS (2013): Standard methods for *Varroa* research. J. Apicultural Res. 52, 1–54.
26. DIETEMANN, V., J. PFLUGFELDER, D. ANDERSON i SUR. (2012): *Varroa destructor*: Research avenues towards sustainable control, J. of Apicultural Research 51, 125–132.
27. ELLIS, J. D., P. A. MUNN (2005): The worldwide health status of honey bees. Bee world 86, 88–101.
28. FORSGREN, E., J. R. DE MIRANDA, M. ISAKSSON, S. WEI, I. FRIES (2009): Deformed wing virus associated with *Tropilaelaps mercedesae* infesting European honey bees (*Apis mellifera*). Exp. Appl. Acarol. 47, 87–97.
29. HOSAMANI, R. K., R. GULATI, S. K. SHARMA (2006): Bioecology and management of honey bee mite, *Tropilaelaps clareae* Delfinado and Baker - a review. Agric. Reviews. 27, 191–199.
30. HOSAMANI, R. K., R. GULATI, S. K. SHARMA, R. KUMAR (2007): Efficacy of some botanicals against ectoparasitic mite *Tropilaelaps clareae* (*Acari: Laelapidae*) in *Apis mellifera* colonies. Syst. Appl. Acarol. 12, 99–108.

31. HRVATSKI SABOR: ZAKON O ZDRAVLJU ŽIVOTINJA (NN 152/2022).
32. KHONGPHINITBUNJONG, K., L. I. DE GUZMAN, M. D. BURGETT, T. E. RINDERER, P. CHANTAWANNAKUL (2012): Behavioural responses underpinning resistance and susceptibility of honey bees to *Tropilaelaps mercedesae*. *Apidologie* 43, 590–599.
33. KIPRASERT, C. (1984): Biology and systematics of the parasitic bee mite *Tropilaelaps clareae* Delfinado and Baker (*Acarina: Laelapidae*). Magistarski rad, Sveučilište Kasetsart , Bangkok.
34. KOENIGER, G., N. KOENIGER, D. L. ANDERSON, C. LEKPRAYOON, S. TINGEK (2002): Mites from debris and sealed brood cells of *Apis dorsata* colonies in Sabah (Borneo) Malaysia, including a new haplotype of *Varroa jacobsoni*. *Apidologie* 33, 15–24.
35. KUMAR, N. R., R. KUMAR, J. MBAYA, R. W. MWANGI (1993): *Tropilaelaps clareae* found on *Apis mellifera* in Africa. *Bee World* 74, 101–102.
36. LAIGO, F. M., R. A. MORSE (1969): Control of the bee mites *Varroa jacobsoni* Oudemans and *Tropilaelaps clareae* Delfinado and Baker with chlorobenzilate. *Philipp. Ent.* 1, 144–148.
37. LE CONTE, Y., M. NAVAJAS (2008): Climate change: impact on bee populations and their illnesses. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 27, 499–510.
38. LEE, B. (1995): Mites bees and plagues that are and might be. *Partners in Research for Development* 8, 2–9.
39. LIN, Z., S. SHEN, K. WANG, T. JI (2023): Biotic and abiotic stresses on honeybee health, <https://doi.org/10.1111/1749-4877.12752>.
40. LIN, Z., Z. ZHU, M. ZHUANG I SUR. (2023): Effects of local domestication warrant attention in honey bee population genetics, *Science Advances* 9.

41. LING, T. C., P. PHOKASEM, C. SINPOO, P. CHANTAWANNAKUL, K. KHONGPHINITBUNJONG, T. DISAYATHANOOWAT (2023): *Tropilaelaps mercedesae* Infestation Is Correlated with Injury Numbers on the Brood and the Population Size of Honey Bee *Apis mellifera*, *Animals* 13, 8, 1318.
42. MACEDO, P. A., J. WU, M. D. ELLIS (2002): Using inert dusts to detect and assess *Varroa* infestations in honey bee colonies. *J. Apicultural. Res.* 41, 3–7.
43. MAHMOOD, R., E. S. WAGCHOURE, S. RAJA, G. SARWAR, M. ASLAM (2011): Effect of thymol and formic acid against ectoparasitic brood mite *Tropilaelaps clareae* in *Apis mellifera* colonies. *Pakistan J. Zool.* 43, 91–95.
44. MATHESON, A. (1997): Country records for honey bee diseases, parasites and pests. Appendix 11. In R. M. Morse, K. Flottum (Eds). *Honey bee pests, predators and diseases.* A. I. Root Co., Medina, Ohio.
45. Ministarstvo poljoprivrede: Naredba o provedbi i financiranju mjera sprječavanja, kontrole i nadziranja bolesti životinja na području republike hrvatske (NN 1/2023).
46. Ministarstvo poljoprivrede: Pravilnik o mjerama suzbijanja i iskorjenjivanja pčelinjih bolesti (NN 114/2004).
47. [entnemdept.ufl.edu/creatures/MISC/BEES/Tropilaelaps.htm](http://entnemdept.ufl.edu/creatures/MISC/BEES/Tropilaelaps.htm) (18.11.2017).
48. OIE (2004): *Tropilaelaps* infestation of honey bees (*Tropilaelaps clareae*, *T. koenigerum*). In *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees)*. International Office of Epizootics, Pariz.
49. OIE (2017): Infestation of honey bees with *Tropilaelaps spp.* In *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees)*. International Office of Epizootics, Pariz.
50. OSTIGUY, N., D. SAMMATARO (2000): A simplified technique for counting *Varroa jacobsoni* Oud. on sticky boards. *Apidologie* 31, 707–716.

51. OTIS, G. W., J. KRALJ (2001): Parasitic brood mites not present in North America. In T. C. Webster, K. S. Delaplane (Eds). Mites of the honey bee. Dadant and Sons, Illinois, USA.
52. OWEN, I. L. (2011): Parasites of animals in Papua New Guinea recorded at the National Veterinary Laboratory: a catalogue, historical review and zoogeographical affiliations. *Zootaxa*, 3143, 1–163.
53. PEST AND DISEASES IMAGE LIBRARY, [www.bugwood.org](http://www.bugwood.org) (20.03.2018).
54. PETTIS, J. S., R. ROSE, E. M. LICHTENBERG, P. CHANTAWANNAKUL, N. BUAWANGPONG, W. SOMANA, P. SUKUMALANAND, D. VANENGELSDORP (2013): A Rapid Survey Technique for *Tropilaelaps* Mite (*Mesostigmata: Laelapidae*) Detection. *J. Econ. Entomol.* 106, 1535–1544.
55. PICHAJ, K., G. POLGAR, J. HEINE (2008): The efficacy of Bayvarol<sup>®</sup> and CheckMite+<sup>®</sup> in the control of *Tropilaelaps mercedesae* in the European honey bee (*Apis mellifera*) in Thailand. *Apiacta* 43, 12–16.
56. RATH, W., M. DELFINADO-BAKER, W. DRESCHER (1991): Observations on the mating behaviour, sex ratio, phoresy and dispersal of *Tropilaelaps clareae* (*Acari: Laelapidae*). *Int. J. Acarol.* 17, 201–208.
57. RATH, W., O. BOECKING, W. DRESCHER (1995): The phenomena of simultaneous infestation of *Apis mellifera* in Asia with the parasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. and *Tropilaelaps clareae* Delfinado and Baker. *Am. Bee J.* 135, 125–127.
58. RITTER, W. (1988): *Varroa jacobsoni* in Europe the tropics and subtropics. In G. R. Needham, R. E. Page, Jr, M. Delfinado-Baker, C. E. Bow (Eds). *Africanized honey bees and bee mites*. Halsted Press, Chichester.
59. RITTER, W., U. SCHNEIDER-RITTER (1986): *Varroa jacobsoni* und *Tropilaelaps clareae* in bienenvolkern von *Apis mellifera* in Thailand. *Apidologie* 17, 384–386

60. RITTER, W., U. SCHNEIDER-RITTER (1988): Differences in biology and means of controlling *Varroa jacobsoni* and *Tropilaelaps clareae*, two novel parasitic mites of *Apis mellifera*. In G. R. Needham, R. E. Page, Jr, M. Delfinado-Baker, C. E. Bow (Eds). Africanized honey bees and bee mites. Halsted Press, Chichester.
61. RITTER, W., P. AKRATANAKUL (2006): Honey bee diseases and pests: a practical guide. Agricultural and Food Engineering Technical Report. FAO, Rome, Italy.
62. SAMMATARO, D., U. GERSON, G. NEEDHAM (2000): Parasitic mites of honey bees: life history, implications and impact. *Annu. Rev. Entomol.* 45, 519–548.
63. SCHMID-HEMPEL, P. (1998): Parasites in social insects. Princeton University Press, Princeton.
64. SHARMA, S. D., N. P. KASHYAP, R. DESH (2003): Efficacy of some acaricides against ectoparasitic mite *Tropilaelaps clareae* infesting European honey bee *Apis mellifera*. *Indian J. Agric. Res.* 37, 60–63.
65. SHRESTHA, M., J. WEGENER, I. GAUTAM, M. SINGH, C. SCHWEKENDIEK, K. BIENEFELD (2020): Individual level comparisons of honey bee (*Hymenoptera: Apoidea*) hygienic behavior towards brood infested with *Varroa destructor* (*Parasitiformes: Varroidae*) or *Tropilaelaps mercedesae* (*Meostigmata: Laelapidae*), *Insects* 11 (8), 510.
66. SMILEY, R. L. (1991): Insect and Mite Pests in Food, an Illustrated Key, J. R. Gorham, ed. Food and Drug Administration, United States Department of Agriculture.
67. TANGJINGJAI, W., P. VERAKALASA, S. SITTIPRANEED, C. LEKPRAYOON (2003): Genetic differences between *Tropilaelaps clareae* and *Tropilaelaps koenigerum* in Thailand based on ITS and RAPD analyses. *Apidologie* 34, 514–524.
68. TLAK GAJGER, I., L. SVEČNJAK, D. BUBALO, T. ŽORAT (2020): Control of *Varroa destructor* mite infestations at experimental apiaries situated in Croatia. *Diversity* 12, 12.



69. UNDERWOOD, B. A (1986): The natural history of *Apis laboriosa* Smith in Nepal. Magistarski rad, Sveučilište Cornell, Ithaca, New York.
70. YUSHENG, Y., Z. ZUYUN, L. HUANXIAN, Z. HONGMU, Z. XUEWEN (2011): Control effect of sublimed sulfur paired with acaricide on bee mites. Agricultural Science and Technology – Hunan 12, 241–243.
71. WAGHCHOURE-CAMPHOR, E. S., S. J. MARTIN (2009): Population changes of *Tropilaelaps clareae* mites in *Apis mellifera* colonies in Pakistan. J. Apicultural Res. 48, 46–49.
72. WILDE, J. (2000): Is it possible to introduce *Tropilaelaps clareae* together with imported honey bee queens to Europe? Pszczeln. Zesz. Nauk. 44, 155–162.
73. WOYKE, J. (1984): Survival and prophylactic control of *Tropilaelaps clareae* infesting *Apis mellifera* colonies in Afghanistan. Apidologie 15, 421–434.
74. WOYKE, J. (1985A): *Tropilaelaps clareae* a serious pest of *Apis mellifera* in the tropics, but not dangerous for apiculture in temperate zones. Am. Bee J. 125, 497–499.
75. WOYKE, J. (1985B): Further investigation into control of the parasitic bee mite *Tropilaelaps clareae* without medication. J. Apicultural Res. 24, 250–254.
76. WOYKE, J. (1987): Length of successive stages in the development of the mite *Tropilaelaps clareae* in relation to honey bee brood age. J. Apicultural Res. 26, 110–114.
77. WOYKE, J. (1994): Mating behaviour of the parasitic honey bee mite *Tropilaelaps clareae*. Exp. Appl. Acarol 18, 723–733.
78. WOYKE, J., J. WILDE, C. C. REDDY (2004): Open-air-nesting honey bees *Apis dorsata* and *Apis laboriosa* differ from the cavity-nesting *Apis mellifera* and *Apis cerana* in brood hygiene behaviour. J. Invertebr. Pathol. 86, 1–6.

79. WONGSIRI, S., P. TANGKANASING, H. A. SYLVESTER (1989): The resistance behaviour of *Apis cerana* against *Tropilaelaps clareae*, Proc. First Asia-Pacific Conf. of Entomol. Chiang Mai, Thailand.

## 5. SAŽETAK

### Tropileloza

*Ana-Marija Kukovec*

Tropileloza je nametnička bolest pčelinjeg legla uzrokovana hemofagnim grinjama iz roda *Tropilaelaps*. Prirodni nosioci ovih grinja su slobodno živuće divovske azijske pčele *Apis dorsata*, *Apis breviligula* i *Apis laboriosa*. *Tropilaelaps* grinje su prešle na novog nosioca, europsku medonosnu pčelu (*Apis mellifera*) nakon njezinog uvoza u Aziju. Unutar roda *Tropilaelaps* se nalaze četiri vrste. Dvije vrste su sposobne parazitirati na europskoj medonosnoj pčeli, i to: *Tropilaelaps clareae* i *Tropilaelaps mercedesae*. Za preostale dvije vrste: *Tropilaelaps koenigerum* i *Tropilaelaps thaiti* se smatra da su bezopasne za *Apis mellifera*. Invazije *Tropilaelaps* spp. grinjama dovode do velikih šteta na pčelinjim ličinkama i kukuljicama (malformacije legla), ugibanja mladih pčela i u konačnici do propadanja pčelinje zajednice. Iako je tropileloza još uvijek prisutna samo u Aziji, prepoznata je kao velika prijetnja svjetskom pčelarstvu. Stoga je uvrštena na listu opasnih zaraznih bolesti pčela Svjetske organizacije za zdravlje životinja. U ovom radu navedene su najnovije spoznaje o biologiji *Tropilaelaps* spp. grinja, štetama koje uzrokuju na pčelinjem leglu i na cijeloj pčelinjoj zajednici, načinima dijagnosticiranja, kontroliranja i prevencije tropileloze.

**Ključne riječi:** *Apis dorsata*, *Apis mellifera*, *Tropilaelaps* spp., štetni učinci, rana dijagnostika

## 6. SUMMARY

### Tropilaelosis

*Ana-Marija Kukovec*

Tropilaelosis is a parasitic disease of honey bee brood caused by haemophagous mites of the genus *Tropilaelaps*. Non-domesticated giant Asian honey bees *Apis dorsata*, *Apis breviligula* and *Apis laboriosa* are native hosts to *Tropilaelaps* mites. These mites spread into the managed European honey bee (*Apis mellifera*) after human had introduced *Apis mellifera* into Asia. There are four species in the genus *Tropilaelaps*. Two species: *Tropilaelaps clareae* and *Tropilaelaps mercedesae* are damaging pests of European honey bee. The other two species: *Tropilaelaps koenigerum* and *Tropilaelaps thaii* appear to be harmless to *Apis mellifera*. *Tropilaelaps* mite infestation causes severe damage to honey bee larvae and pupae (brood malformation), death of young bees and a subsequent colony decline. Although tropilaelosis still remains confined to Asia, it is recognized as emerging threat to world apiculture. Therefore, tropilaelosis is on the list of serious diseases which endanger the whole world, according to the World Organisation for Animal Health. This thesis provides a current knowledge in the main fields of *Tropilaelaps* spp. research, including the biology of mites, damage on the honey bee brood and colonies, early diagnostic methods, control measures and prevention of tropilaelosis.

**Keywords:** *Apis dorsata*, *Apis mellifera*, *Tropilaelaps* spp., damage effects, early diagnostics

## 7. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 17. svibnja 1985. godine u Zagrebu. Osnovnu školu „Izidor Kršnjavi“ u Zagrebu, završila sam 2000. godine. Nakon toga sam upisala V. gimnaziju prirodoslovno-matematičkog usmjerenja gdje sam maturirala 2004. godine. Iste godine upisala sam Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.