



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2014 00784**

(22) Data de depozit: **22/10/2014**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **28/01/2022** BOPI nr. 1/2022

(41) Data publicării cererii:
29/05/2015 BOPI nr. 5/2015

(73) Titular:
• **INSTITUTUL DE CERCETARE
DEZVOLTARE PENTRU APICULTURĂ
S.A., BD. FICUSULUI NR.42, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **ȘAPCALIU AGRIPINA,
STR. DRUMUL POTCOAVEI NR. 28B,
VOLUNTARI, IF, RO;**
• **MATEESCU CRISTINA,
STR. DOAMNA OLTEA NR.39, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **SAVU VASILICĂ, STR. FLOARE ROȘIE
NR.7, BL.51, SC.3, ET.3, AP.95, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **MILITARU IOANA,
STR. ROȘIA MONTANĂ NR.3, BL.M20,
SC.4, AP.133, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **RĂDOI ION,
STR. CONSTANTIN BRÂNCOVEANU
NR. 81,BL. 27, AP. 82, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **DOBRESCU SIMONA,
STR. ȘTEFAN CEL MARE NR. 30, BL. 26,
SC. 1, ET. 9, AP. 25, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **MATEI MARIOARA, STR. SOMEȘUL
RECE NR. 1-9, BL. 6, SC. 1,ET. 7, SECTOR
1, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **ANGELESCU GEORGE-DORU,
STR. MĂRĂȘEȘTI NR. 2, BUFTEA, IF, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**RO 122337 B1; CN 103055076 A;
CN 103110632 A**

(54) **PRODUS APIFITOTERAPEUTIC DE UZ VETERINAR
PENTRU TRATAMENTUL ȘI PREVENȚIA NOSEMOZELOR
ÎN FAMILIILE DE ALBINE**



RO 130212 B1

1 Prezenta invenție se referă la un produs apifitoterapeutic de uz veterinar cu aplicație
directă în controlul unor boli grave induse de specii ale genului *Nosema spp.* la albine (*Apis*
3 *mellifera Carpathica*), numite nosemoze. Produsul are implicații directe pentru practica vete-
rinară și pentru domeniul apicol deoarece se adresează unei patologii grave cu efecte nega-
5 tive majore în evoluția familiilor de albine, are și implicații directe asupra biodiversității în
natură și asupra economiei naționale.

7 Nosemoza este o afecțiune parazitară gravă a albinelor adulte (lucrătoare, matcă,
trântori) și uneori a puietului (purtători), corelată cu pierderi economice importante și depo-
9 pularea coloniilor de albine (OIE, 2008) atât în Europa (inclusiv România) cât și în toată
lumea (Bailey, 1991; Higes et al., 2006; Huang et al., 2007). Agenții etiologici (*Nosema apis*
11 și *Nosema ceranae*), au un caracter ubicvitar și oportunist și au fost semnalati pe teritoriul
țării noastre în anii 1934 (*Nosema apis*, F. Begnescu) și 2008 (*Nosema ceranae*, I.D.S.A.
13 București). Transmiterea parazitozei se realizează prin spori ingerați pe cale orală, având
ca surse principale de contaminare fecalele albinelor, apa, mierea, polenul, dar și schimburile
15 de hrană între albine, schimbul de material biologic între stupini (Jay, 1966), echipamente
apicole contaminate (Klee et al., 2007) și stupăritul pastoral (Giersch et al., 2009). *Nosema*
17 *ceranae* este implicată în fenomenul CCD (Colony Collapse Disorder) (Higes M., et. al, 2008,
Savu Vasilică et. al. 2013), care provoacă pierderi considerabile în SUA (Chen et al., 2007),
19 Asia și Europa (Higes et al, 2008b), posibil și în România. Este important de subliniat faptul
că acest parazit unicelular își creează forme de rezistență (spori) și își dezvoltă ciclul biologic
21 în principal în intestin, care devine rezervorul principal de infestație de unde se răspândește
în mediu, având putere mare de infestare a stupinilor. Dezvoltarea bolii este corelată cu
23 factorii favorizanți (climatici, curenți alimentare, imunocompetența gazdei).

Tratarea nosemozei în familiile de albine se bazează în mod curent pe utilizarea unor
25 antibiotice de sinteză și a unor produse de sinteză non-antibiotice. Administrarea medica-
mentelor antiparazitare se face sub formă de sirop sau în turte în doze ridicate și pe interval
27 scurt de 4-5 zile atunci când se face în scop terapeutic, în dozaj minimal și cure lungi (1-2
luni) când se aplică în scop profilactic. Combaterea bolilor la albine în România se realizează
29 atât prin tratamente medicamentoase autorizate, cât și prin alte mijloace sanitare sau
biotehnologice.

31 I. Produse Non-Antibiotice:

A) în România se comercializează, în 2014, următoarele două produse:

33 1. Protofil (ICDA-România) - produs românesc, obținut și brevetat de Institutul de
Cercetare-Dezvoltare pentru Apicultură București, pe baza unor extracte din plante din flora
35 spontană în alcool de 96° (*Taraxacum officinalis* - păpădie, *Ocimum basilicum* - busuioc,
Achillea millefolium - coada șoricelului, *Thymus vulgaris* - cimbrisor) recomandat ca vitalizant,
37 detoxifiant, cicatrizant și antidiareic, în sirop sau turte de zahăr. Nu este destinat pentru
acțiune antiparazitară la familiile de albine infestate cu parazitul *Nosema ceranae*.

39 2. *Nonos* (Ungaria) - produs fitoterapeutic, pe bază de acid ortohidroxibenzoic.

B) În Europa se comercializează următoarele produse:

41 1. *Nosestat* (Bulgaria) - produs de Institutul Apicol din Bulgaria pe bază de acid formic
și iod, substanțe de sinteză. Produs potențial toxic pentru om prin acidul formic și prin iod.

43 2. *Nozevit* (Croatia) - pe bază de extract hidroalcoolic din scoarță de stejar. Durata
administrării este de 14 zile preventiv sau curativ. Potențial toxic prin alcoolul concentrat și
45 prin solventul eter alcool.

47 3. *Tymol* and Garlic sirop (Grecia) - produs fitoterapeutic produs în Grecia, acțiune
nespecifică, potențial toxic, nu acționează împotriva *Nosema ceranae*.

RO 130212 B1

4. *ApiHerb* (Italia) - produs ecologic, extract fitoterapeutic cu efect tonic, stimulator, antidiareic, cicatrizant, cu formulă complexă, administrat în sirop, nu prezintă acțiune antiparazitară. Ineficace în infestația cu *Nosema ceranae*. Produs scump, sensibil, durată mare de administrare, repetabilitate la intervale variabile, în funcție de gradul de infestare. Nu s-a dovedit a fi eficace în profilaxia paraziților.

5. *Vita Feed Gold* (Regatul Unit) - produs de sinteză pe bază de acid salicilic solubilizat în melasă de sfeclă, nu are un efect specific antiparazitar, nu are efect profilactic. Ineficient în infestația cu *Nosema ceranae*. Se pot acumula reziduuri de acid salicilic în produsele stupului (în miere, polen, lăptișor).

II. Produse antibiotice

a) *Fumidil B* este un produs antibiotic pe bază de fumagilină, folosit în tratamentul microsporidiozelor și amoebiozelor. În prezent, acesta este interzis a se folosi în combaterea nosemozei în unele țări din Uniunea Europeană (inclusiv în România), deoarece există riscul apariției reziduurilor în miere și în produsele stupului, are acțiune doar asupra formelor vegetative și nu acționează asupra sporilor (formă de rezistență).

Produsele utilizate astăzi în tratamentul și prevenția nosemozei sunt produse care conțin în special substanțe de sinteză și/sau antibiotice, care prezintă o serie de dezavantaje:

- se pot regăsi ca reziduuri în miere și în produsele stupului;
- pot intoxica albinele adulte și puietul;
- acționează împotriva paraziților, dar afectează și organismul albinei;
- induc fenomene secundare (uzura albinelor, favorizarea dezvoltării drojdiilor etc);
- nu acționează asupra sporilor paraziților de *Nosema spp.*;
- nu au acțiune asupra speciei *Nosema ceranae*.

Cercetările efectuate de autori, care au stat la baza formulării prezentei invenții au avut ca punct de plecare rezultate a unor observații anterioare asupra patogenității parazitului și a ciclului biologic al acestuia.

La nivelul intestinului mijlociu sporii de *Nosema spp.* germinează prin eliberarea unui filament polar și pătrund în celulele epitelului intestinal, unde își desfășoară ciclul de înmulțire. Celulele lizate eliberează un număr mare de spori, iar sporii eliberați continuă ciclul de dezvoltare în alte celule, pe care le infectează și le parazitează. În funcție de nivelul invaziei, fenomenele de distincție tisulară se extind, apar zone de necroză, structurile afectate nu mai pot fi recuperate prin procesele de regenerare și astfel procesele de digestive și de absorbție sunt perturbate, generând în timp moartea gazdei.

Reîncadrarea agentului etiologic la grupul de miceti a condus la o reevaluare a patogenității, rezistenței parazitului și a terapiei bolii, inclusiv a mijloacelor de apărare ale gazdei. Este important de subliniat faptul că acest parazit unicelular își creează forme de rezistență (spori) și își dezvoltă ciclul biologic în principal în intestin, care devine rezervorul principal de infestație. El se răspândește ușor în mediu, având putere mare de contaminare a stupinilor.

O altă perturbare se petrece la nivelul glandelor hipofaringiene unde se elaborează lăptișorul de matcă. Ca urmare a instalării bolii, procesul este corelat cu perturbarea creșterii și dezvoltării puietului și intrarea în involuție a coloniei de albine. În cazul în care infestarea albinelor are loc vara târziu sau toamna, se constată și perturbări și în formarea corpului gras.

Dezvoltarea bolii este corelată cu factorii favorizanți (climatici, carențe alimentare, imunocompetența gazdei), iar adesea ea survine pe terenul unor infecții preexistente induse de alți agenți bacterieni, fungici sau virali. În tot acest context, orice strategie terapeutică, respectiv orice formulă farmaceutică, trebuie să țintească toate verigile implicate în patogenia bolii și mecanismele de răspândire ale parazitului și să activeze mecanismele de apărare ale

RO 130212 B1

1 gazdei. Produsul conceput de autori, care face obiectul prezentei inovații are avantajul de
a oferi prin compoziție chimică, respectiv prin principiile active și prin activitățile specifice, o
3 alternativă terapeutică eficientă, împotriva noșemosei la albine.

Apicultura reprezintă un domeniu al activității umane cu importanță majoră atât pentru
5 economie cât și sub aspectul biodiversității. În raportul Comisiei pentru Agricultură și
dezvoltare rurală din cadrul Parlamentului European prezentat în ședința din 25 octombrie
7 2011, raportorul european pentru Agricultură recomandă inițierea și susținerea activităților
de cercetare și difuzare a cunoștințelor legate de sănătatea albinelor și elaborarea unor noi
9 strategii de combatere a cauzelor ce afectează calitatea vieții acestora, inclusiv a unor noi
strategii terapeutice în eradicarea bolilor grave. Raportorul menționează că apicultura și biodiver-
11 sitatea depind una de alta, iar albinele prin activitatea lor furnizează deopotrivă importante
beneficii din punct de vedere ecologic, economic și social asigurând securitatea alimentară
13 și conservând biodiversitatea.

Comisia Europeană recomandă țărilor europene să întărească susținerea cercetării
15 în domeniul sănătății albinelor în contextul următorului cadru financiar (CF8) cu orientare
spre dezvoltarea unor noi metodologii de prevenție și control a bolilor majore la albine și a
17 obținerii unor medicamente veterinare pentru lupta contra agenților etiologici. Se recomandă
utilizarea unor molecule și a unor formule farmaceutice pe bază de acizi organici, uleiuri
19 esențiale și a altor substanțe autorizate în lupta biologică contra paraziților. Raportorul
european invită statele europene să asigure o susținere financiară cercetării, dezvoltării și
21 testării unor noi medicamente ce vizează sănătatea albinelor și să încurajeze industria
farmaceutică să dezvolte producția noilor medicamente destinate controlului bolilor la albine.
23 (Rapport, Commission de lagriculture et du developpment rural, 25 octobre 2011, rapporteur
Csaba Sandor Tabajdi).

25 În acest context s-a cerut Comisiei Europene să elaboreze noi reguli, mult mai
flexibile, de autorizare și punere pe piață a unor produse veterinare adresate tratamentului
27 bolilor la albine, cu specificarea celor de origine naturală și a altora, care nu aduc atingeri
sănătății insectelor, ce respectă siguranța alimentelor și echilibrul ecologic. Se adresa, de
29 asemenea cererea de modificare a cadrului de reglementare a Agenției Europene a medica-
mentului, în scopul protejării drepturilor intelectuale, astfel încât acestea să fie în măsură să
31 garanteze exclusivitatea producției și comercializării noilor substanțe active din compoziția
produselor veterinare inovative. Prezentul brevet se încadrează în linia acestor recomandări,
33 aducând o abordare complex și originală.

Produsul fitoterapeutic NOSE-APIV7 este un produs condiționat sub formă de soluție,
35 cu administrare orală (inclus în sirop de zahăr sau în turte).

Produsul are în compoziție: tinctură de propolis 5-30% în greutate, extract hidro-
37 alcoolice de busuioc 10-25% în greutate, extract hidroalcoolic de frunze de nuc 10-25% în
greutate, extract hidroalcoolic de cimbrisor 10-20% în greutate, extract hidroalcoolic de pelin
39 10-25% în greutate, extract hidroalcoolic de roiniță 15-30% în greutate și vitamina C 0,1-
0,4% în greutate. Toate aceste extracte utilizate în formulare aduc un conținut ridicat de
41 principii biologice active ca proporție și acțiuni specifice și complexe, (antiseptice, antipara-
zitare, antiinflamatoare, imunomodulatoare, antioxidante și regenerative), după cum
43 urmează:

- Tinctură de propolis utilizat ca extract vegetal, are un conținut ridicat în rășini, balsa-
45 muri, uleiuri vegetale, ceară, aminoacizi liberi (prolină, arginină), terpeni, vitamine, oligoele-
mente (Al, Ag, Co, Fe, Mg, Mn, Cu), flavonoizi. El are activitate antimicrobiană, antioxidantă,
47 antiinflamatoare și antiparazitară.

- Extractul hidroalcoolic din busuioc (*Ocimum basilicum*) are în compoziție uleiuri
49 volatile 0,05-0,25% în greutate de tipul eugenol, camfor, camfen, ametol, citronelol, piron,
ocinon, terpineol, linalol, metil clavicol, gennanol, mircen, cu acțiuni variate: antiseptic,
51 antibacterian, decongestiv, imunomodulator, antioxidant, cicatrizant.

RO 130212 B1

- Extractul hidroalcoolic din cimbrisor (*Thymus vulgaris*) are un conținut ridicat de uleiuri volatile 0,1-0,30% în greutate - terpinen, cis-sabien citrat, limalol, *p*-cinen, alături de hidrocarburi terpenice, compuși organici (cineol, borneol, nerol, time, citronelol), derivați flavonici (luteolină, glicozidaze), triterpene (acid ursilic, acid oleanolic) și acizi policarboxilici. Acțiunile specifice sunt corelate în principal cu produșii fenolici din uleiurile volatile și tanin: antiseptic, antibacterian, antifungic, antiviral, antioxidant, antiparazitar (prin timol și carvacril). Flavonele polimetoxilate determină acțiune cicatrizantă.

- Extractul hidroalcoolic din roiniță (*Melissa officinalis*) cu conținut ridicat în uleiuri volatile 0,05-0,3% în greutate de tipul citronelal, beta-cariofilen, linalol, limanen, ocinen, germacren D, metil-carvinon, anetol. Acțiunile specifice pe care le conferă produsului sunt în principal antiinflamatoare, antivirale.

- Extractul hidroalcoolic din pelin (*Artemisia absinthium*) ce reunește principii amare, derivați flavonici, acizi carboxilici, uleiuri volatile fiind corelat cu acțiuni specifice regeneratoare, cicatrizante, antiparazitare.

- Extractul hidroalcoolic din frunze de nuc (*Juglans regia*) are un conținut ridicat de uleiuri volatile 0,05-0,25 în greutate, tanin, flavone, substanțe minerale, vitamine, iod organic. El generează acțiuni antiseptice, antihistaminice, cicatrizante, antimicotice, antidiareice.

- Vitamina C, antioxidant hidrosolubil, cel mai important pentru organism, care intervine în imunitate și joacă un rol important în reducerea proceselor inflamatorii prin reducerea radicalilor liberi (combate agresiunile peroxidante ale radicalilor liberi din celule).

Produsul este realizat după un procedeu standard de fabricație (care un face obiectul revendicării) ce respectă normele de Bună practică pentru fabricarea și producția farmaceutică. Procedeele de fabricație, condiționare și controlul pe flux sunt redată în tabelul 1.

Cronologia operațiilor și fluxul tehnologic pentru obținerea produsului apifitoterapeutic NOSE-APIV7

Tabelul 1

Materia primă	Cronologia operațiilor	Controlul în curs	
tinctură de propolis, extract hidroalcoolic de busuioc, extract hidroalcoolic de frunze de nuc, extract hidroalcoolic de cimbrisor, extract hidroalcoolic de pelin, extract hidroalcoolic de roiniță și vitamina C	Achiziționare de materii prime, solvent, excipienți	Verificare specificațiilor tehnice ale materiilor prime	29
		Verificare intermediară	31
	Pregătire materii prime și a vaselor pentru introducere la macerat (cântărire, mărunțire)	Timp de macerare	33
		Verificare intermediară	35
Solvent (alcool etilic 96°)	Amestecare materii prime și solvent	Tehnica specifică	37
		Verificare intermediară	39
	Obținerea de extracte hidroalcoolice din plante	Analiza interfazică a produsului (examene: organoleptic, fizico-chimic și microbiologic)	41
Verificare intermediară		43	
Excipienți	Obținerea soluției finale	Analiza finală a produsului (examene: organoleptic, fizico-chimic și microbiologic)	45
		Verificare finală	47
	Ambalare primară (Flacon 500 ml, etichetare)	Eliberare B.A. produs finit (identificare lot)	49
	Depozitare	Verificare condiții de păstrare	

RO 130212 B1

1 Compoziția chimică a produsului reunește principii biologic active cu proprietăți și
acțiuni specifice ce interfera cu diferitele etape din ciclul biologic al parazitului *Nosema spp.*
3 Produsul intervine în controlul bolii îndeosebi prin inhibarea ciclului de multiplicare (dezvol-
tarea sporilor), reducerea fenomenelor destructive la nivelul tubului digestiv și inducerea unor
5 procese regenerațive tisulare la acest nivel.

Avantajele produsului apifitoterapeutic NOSE-API V7:

7 - este un produs în totalitate natural, cu un procent ridicat de principii biologic active
(uleiuri volatile, triterpene, acizi policarboxilici, tanin, flavone, balsamuri, rășini, vitamine,
9 oligoelemente);

11 - are în compoziție extracte vegetale hidroalcoolice, cu conținut ridicat în uleiuri
volatile (busuioc, roiniță, pelin, frunze de nuc), tinctură de propolis, îmbogățite cu vitamina
C sub formă de acid ascorbic;

13 - formula sa complexă determină acțiuni multiple și sinergice ale diferitelor principii
biologic active, cu efecte directe asupra parazitului, dar și cu efecte pozitive la nivelul gazdei,
15 stopând mortalitatea și crescând imunocompetența gazdei;

17 - este un produs care nu induce fenomene secundare sau toxice la nivelul gazdei sau
în stupină, așa cum pot antrena medicamentele de sinteză;

- prezintă siguranță biologică prin compoziția sa naturală și exclude riscul ecologic;

19 - permite administrarea pe perioadă scurtă și/sau lungă, fiind comod de administrat
(sirop sau turte);

21 - prezintă o bună absorbție și toleranță digestivă a albinei;

23 - este și un nutrient eficient pentru păstrarea echilibrului metabolic (prin compoziția
în oligoelemente, vitamine, aminoacizi);

25 - constituie un adjuvant eficient într-o rație alimentară echilibrată, prin aportul de
vitamine și minerale, bioflavoide, acizi polifenolcarboxilici, fitosteroli, taninuri, carotenoizi,
uleiuri volatile, vitamine A, E, B, PP, flavonoizi, rășini, balsamuri, oligoelemente (Al, Ag, Co,
27 Fe, Mn, Cu), lectine, quercetol, terpene;

29 - produsul oferă un aport de carbohidrați, vitamine, minerale, necesare menținerii unei
homeostazii generale;

31 - produsul are acțiuni complexe, care converg sinergie pentru a asigura acțiunile sale
curative: antiparazitare, antiseptice, imunomodulatoare, antiinflamatoare, antioxidante,
regeneratoare;

33 - produsul a fost testat preclinic în condiții de laborator și susținut clinic în condiții de
teren (stupini proprii și private);

35 - nu există până în prezent pe piață în țara noastră un alt produs axiti-*Nosema*, care
să acționeze și asupra speciei *Nosema ceranae*, iar acest produs răspunde la nevoile
37 stringente ale apicultorilor din România;

39 - produsele de import nu au eficacitatea scontată, deoarece nu au fost concepute și
testate conform condițiilor climatice din țara noastră;

41 - efectul profilactic al produsului față de nosemoză reprezintă un atu pentru utilizarea
acestui de către apicultori.

Rezultatele testelor farmacologice

43 Testările preclinice farmacologice au fost efectuate pe modele *in vitro* și *in vivo*,
demonstrând în ambele variante de lucru eficiența compoziției produsului NOSE-API V7 în
45 controlul parazitozei induse de *Nosema spp.*

47 Testarea pe modelul *in vitro* s-a efectuat pentru toate extractele vegetale incluse în
formulă și apoi pentru formula finală (produs finit). Modelul ales pentru experiment a fost
mierea infestată natural cu spori de *Nosema spp.* Protocolul de lucru a urmărit:

49 - determinarea numărului de spori de *Nosema spp.* pe eşantioane de miere infestată
natural (număr mediu spori/gram miere polifloră)(sinteză în tabelul 2);

RO 130212 B1

- aprecierea efectului antiparazitar al extractelor vegetale (1-20) utilizând ca variante de lucru "in vitro" mierea infestată natural, comparativ cu martori (M_I - martor Blanc, M_{II} - martor activ);

- stabilirea dozei de administrare, utilizând modelul "in vitro" a mierii infestate natural;

- stabilirea dozei de administrare, utilizând modelul "in vitro" sirop de miere/apă (1:1) și sirop de zahăr/apă (1:1);

- stabilirea dozei de administrare, pe baza modelului "in vivo", utilizând familii de albine infestate și administrarea lui sub formă de miere/apă (1:1) și sirop de zahăr/apă (1:1).

Diagnosticul de laborator efectuat pe probele de miere prin examen microscopic direct a evidențiat o încărcătură variabilă a probelor de miere, numărul de spori fiind cuatificat între 1-41 spori/câmp microscopic. Determinarea numărului de spori din mierea infestată natural și selecționarea tipurilor de miere infestate ca model de cultură "in vitro", reprezintă un element de noutate în proiectarea studiului farmacologic ce a stat la baza formulării produsului.

Selecționarea tipului de miere infestată cu spori de *Nosema spp.*

Tabelul 2

Nr. probă	Tip de miere	Medie nr. spori/câmp microscopic	Observații
1	Polifloră	1	
2	Floarea-soarelui	4	
3	Polifloră	6	
4	Polifloră	8	
5	Polifloră	14	
6	Polifloră	13	
7	Polifloră / scaieți	2	
8	Polifloră	7	
9	Tei	2	
10	Floarea-soarelui	2	
11	Floarea/soarelui/mană	9	
12	Polifloră	12	
13	Polifloră / scaieți	14	
14	Polifloră	14	
15	Polifloră	2	
16	Floarea-soarelui	6	
17	Polifloră	12	
18	Polifloră / tei	2	
19	Polifloră	5	
20	Polifloră	14	
21	Polifloră	1	
22	Polifloră	3	
23	Polifloră	3	
24	Polifloră	4	
25	Miere polifloră/floarea soarelui/apicultor particular	15	selecționată
26	Miere polifloră/rașiță/ apicultor particular	41	selecționată

RO 130212 B1

1 Aprecierea efectului antiparazitar *in vitro* s/a efectuat pe 2 variante de lucru: creșterea
în flacoane și creșterea în plăci prin cuantificarea sporilor.

3 a) Varianta 1 de lucru (cultură în flacoane)

După 8 zile de la debutul experimentului s/a observat că extractele vegetale au o
5 activitate antiparazitată „*in vitro*”. În urma examenelor microscopice repetate, după 1(T₁), 2,
3, 6, 8 și 11 zile (T₆) au fost selecționate cele mai active extracte (1-10), care au redus
7 numărul de spori de la 7 spori/câmp microscopic la momentul T₀, la 1 până la 4 spori /câmp,
după 11 zile (T₆). Tinctura de propolis a prezentat cea mai mare activitate antiparazitară „*in*
9 *vitro*”, reducând numărul de spori la un spor/câmp microscopic, după 11 zile. Pe baza
acestor experimente au fost formulate 10 compoziții reprezentând 10 variante de lucru, care
11 au inclus extractele vegetale hidroalcoolice și tinctura de propolis (V₁-V₁₀) (tabelul 3).
Testarea „*in vitro*” a extractelor vegetale, comparativ cu M_I (Martor Blanc), M_{II} (Martor activ
13 P), a probat eficiența antiparazitară a fiecărui extract (tabelul 3).

15 Rezultatul testării efectului antiparazitar în varianta I (cultura în flacoane), comparativ cu
Martor Blanc (MI), Martor activ P (MII), în condiții controlate T (28 °C), H (37,2%)

Tabelul 3

Proba/Materie primă	1 (pelin)	2 (roiniță)	3 (nuc)	4 (cimbrisor)	5 (busuioc)	6 (nuc/frunze)	7(tinctura propolis)	MII	MI	Obs.
Miere (g)/T0	30	30	30	30	30	30	30	30	30	
Medie nr spori/câmp/direct/ T0	7	7	7	7	7	7	7	7	7	
Tip Na/Nc	Na-Nc†	Na-Nc†	Na-Nc†	Na-Nc†	Na-Nc†	Na-Nc†	Na-Nc†	Na-Nc†	Na-Nc†	
Administrare materie primă (ml)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	
T1 (după 1 zile)	2	3	3	2	3	3	3	3	3	
T2 (după 2 zile)	2	3	30	3	10	7	1	3	3	
	Na†-Nc	Na†-Nc	Na†-Nc	Na†-Nc	Na†-Nc	Na†-Nc	Na†-Nc	Na† - Nc	Na† - Nc	
T3 (după 3 zile)	2	30 - nenumărabili	2	6	8	2	2	19	6	
	Na†-Nc	Na-Nc	Na-Nc	Na-Nc†	Na-Nc†	Na-Nc	Nc	Na-Nc†	Na†-Nc	
Administrare materie primă (ml)	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	-	
T4 (după 6 zile)	2	5	4	4	8	5	4	4	6	
	Nc	Na†-Nc	Na-Nc	Na	Na-Nc†	Na-Nc†	Na-Nc	Na-Nc†	Na-Nc†	
T5 (după 8 zile)	1	2	2	1	2	3	5	3	9	Nc înmulțire la 72 h
Administrare materie primă (ml)	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	-	
T6 (după 11 zile)	2	4	10	8	4	16	1	4	7	
	Nc	Na†-Nc	Na-Nc	Na	Na-Nc†	Na-Nc†	Na-Nc	Na-Nc†	Na-Nc†	

*P - nr. proba, N_a (Nosema apis), N_c (Nosema ceranae), † număr crescut

RO 130212 B1

După prima administrare, la momentul T_0 , a avut loc reducerea numărului de spori pentru varianta V7 de la 7 spori/câmp la 1 spor/câmp, efect similar cu cel obținut la administrarea de tinctură de propolis (un spor/câmp) și extractul hidroalcoolic nr. 1 (2 spori/câmp) (tabelul 3).

Experimentul incluzând modelul de creștere în flacoane cu M_{II} (Martorul P), a arătat că la doza de 0,9 ml a scăzut numărul de spori de *Nosema spp.* de la 7 spori/câmp la 4 spori/câmp după 72 h, comparativ cu M_I (Martorul netratat), la care numărul de spori a rămas la 7 spori/câmp. Pentru 0,3 ml M_{II} (Martor P)/30 g miere, efectul de inhibiție a fost similar cu cel pentru variantele de extract, adică 4 spori/câmp la 3 zile, iar extractele au redus de la 7 spori/câmp la 4 spori/câmp.

b) Varianta a 2^a de lucru (cultură în Plăci Petri)

Experimentul efectuat pe mierea infestată natural cu diferite principii active vegetale conținute în extractele vegetale și propolis, a permis evaluarea activităților specifice ale extractelor față de spori prezenți în mierea infestată natural, la temperatura de 28°C și umiditatea H (37,3%), prin cuantificarea efectului de inhibiție a dezvoltării sporilor de *Nosema spp.*

Extractele vegetale au prezentat un efect inhibitor variabil împotriva speciilor de *Nosema spp.* (*Nosema apis* sau *Nosema ceranae*), comparativ cu M_I (Martorul netratat) și M_{II} (Martorul P), la care a existat suspiciunea de dezvoltare permanentă de spori de *Nosema ceranae*.

În condiții de temperatură constantă (28°C) s-a constatat la 3 zile de la testarea extractelor o scădere a numărului de spori, de la 7 spori/câmp la 4 spori/câmp pentru M_{II} , la 2 spori/câmp pentru unele extracte, inclusiv pentru V7, comparativ cu 7 spori/câmp pentru M_I .

Evaluarea după 7 zile a evidențiat o creștere a numărului de spori la 14 spori/câmp în cazul M_{II} și respectiv 8 spori/câmp pentru M_I . Culturile pe care s-au testat extractele vegetale au prezentat între 2 și 7 spori/câmp. Aceasta demonstrează că extractele limitează multiplicarea sporilor, dar obligatoriu este necesară a II^a administrare, la maximum 3 zile și eventual o doză peste 0,3 ml.

Analiza rezultatelor, a arătat că varianta V7 a constituit formula apifitoterapeutică eficientă, care în urma administrărilor „*in vitro*” a dovedit un efect antiparazitar, prin inhibarea dezvoltării sporilor de *Nosema spp.* (tabelul 4).

Rezultatele experimentelor in vitro efectuat pe mierea infestată natural comparativ cu M_I și M_{II} în condiții controlate T (28 °C), H (37,2%)

Tabelul 4

	Tinctură propolis	Extract Busuioc	Extract Cimbrisor	Extract Roiniță	Extract Pelin	Extract Nuc	Varianta V7	MII	MI
T_0									
Miere (g)	30	30	30	30	30	30	30	30	30
Medie Număr spori Na/Nc/10 câmpuri microscopice	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Tip	$N_a = N_c \uparrow$	$N_a = N_c \uparrow$	$N_a = N_c \uparrow$	$N_a = N_c \uparrow$	$N_a = N_c \uparrow$	$N_a = N_c \uparrow$	$N_a = N_c \uparrow$	$N_a = N_c \uparrow$	$N_a = N_c \uparrow$
Administrare TP + EV (ml)	0,09	0,09+0,03	0,09+0,03	0,09+0,045	0,09+0,045	0,09+0,06	0,3	0,3	-
T_1 /după 1 zi	s:3/p:20	s:4/p:1	s:14/p:9	s:2/p:6	s:14/p:3	s:13/p:10	1/fl deschis 4/fl închis	15/fl deschis 12/fl închis	7
	$N_a=N_c$	$N_a=N_c$	$N_c \uparrow$	$N_a \uparrow=N_c$	$N_a=N_c \uparrow$	$N_a=N_c \uparrow$	$N_a=N_c$	$N_a=N_c \uparrow$	$N_a=N_c \uparrow$
						multiplicare			

Tabelul 4 (continuare)

	Tinctură propolis	Extract Busuioc	Extract Cimbrisor	Extract Roiniță	Extract Pelin	Extract Nuc	Varianta V ₇	MII	MI
T ₂ /după 2 zile	s:0-5/p:0-9	s:0-5/p:0-15	s:0-4/p:0-12	s:0-5/p:0-7	s:0-3/p:0-3	s:0-6/p:0-6	s:0-4/p:0-5	0-15/fl deschis 0-12/fl închis	7
	N _a ↑=N _c /N _a =N _c ↑	N _a ↑=N _c ↑/N _a =N _c ↑	N _a ↑=N _c ↑/N _a =N _c ↑	N _a ↑=N _c ↑/N _a =N _c ↑	N _a ↑=N _c ↑/N _a ↑=N _c	N _a ↑=N _c ↑/N _a ↑=N _c	N _a ↑=N _c ↑/N _a ↑=N _c	N _a ↑=N _c ↑	N _a ↑=N _c ↑
				Spori în diviziune					
T ₃ /după 3 zile	s:3/p:8	s:2/p:9	s:7/p:19	s:3/p:65	s:6/p:6	s:4/p:12	s:3/p:4	s:9/p:8	7
	N _a ↑=N _c /N _a ↑=N _c	N _a ↑=N _c ↑/N _a ↑=N _c	N _a ↑=N _c ↑/N _a ↑=N _c	N _a ↑=N _c ↑/N _a ↑=N _c	N _a ↑=N _c ↑/N _a ↑=N _c	N _a ↑=N _c ↑/N _a ↑=N _c	N _a ↑=N _c ↑/N _a ↑=N _c	N _a ↑=N _c ↑/N _a ↑=N _c	N _a ↑=N _c ↑
			multiplicare	multiplicare					
T ₄ /după 3/zile/Media/câmpuri microscopice	s: 1,3/p: 0,4	s: 1,6/p: 4,5	s: 0,9/p: 0,3	s: 0,3/p: 2,2	s: 0,6/p: 0,7	s: 1,4/p: 1,9	d: s: 0,9/p: 0,3 f: s: 0,1/p: 0,8	s: 1,9/p: 1	s: 9,7/p: 2
	N _a ↑=N _c /N _a ↑=N _c	N _a ↑=N _c ↑/N _a ↑=N _c	N _a ↑=N _c ↑/N _a ↑=N _c	N _a ↑=N _c ↑/N _a ↑=N _c	N _a ↑=N _c ↑/N _a ↑=N _c	N _a ↑=N _c ↑/N _a ↑=N _c	N _a ↑=N _c ↑/N _a ↑=N _c	N _a ↑=N _c ↑/N _a ↑=N _c	N _a ↑=N _c
		multiplicare	multiplicare						
Administrare a 2-aTP + EV(ml)	0,09	0,09+0,03	0,09+0,03	0,09+0,045	0,09+0,045	0,09+0,06	0,3	0,3	-
T ₈ /după 8 zile	s: 4,1/p: 1,4	s: 1,2/p: 5,8	1,7 2,3	1,6 3,4	0,8 2,4	0,5 3,3	0,1 1,2	2,1 4,9	1,4 7,1
Medie spori/10 câmpuri microscopice	2,8	3,5	2	2,5	1,6	1,9	0,7	3,5	4,3
	N _a ↑=N _c /N _a ↑=N _c	N _a ↑=N _c ↑/N _a ↑=N _c	N _a ↑=N _c ↑/N _a ↑=N _c	N _a ↑=N _c ↑/N _a ↑=N _c	N _a ↑=N _c ↑/N _a ↑=N _c	N _a ↑=N _c ↑/N _a ↑=N _c	N _a ↑=N _c ↑/N _a ↑=N _c	N _a ↑=N _c ↑/N _a ↑=N _c	N _a ↑=N _c ↑/N _a ↑=N _c
T ₈ /după 8 zile	s: 1,95/p: 2,95	s: 2,5/p: 4,3	2,4 2,3	2,3 1,1	1,3 1,8	2,6 1,3	1,3 1,2	4,6 2,8	3 2,4
Medie spori/10 câmpuri microscopice	2,45	3,4	2,35	1,7	1,5	1,95	1,25	3,7	2,7

*P - nr. proba, Na (*Nosema apis*), Nc (*Nosema ceranae*), s superficial, p- profund, număr crescut

Efectuarea de testări „*in vitro*” ale extractelor vegetalele și ale variantei V₇ (produs final apifitoterapeutic), comparativ cu M_{II} și respectiv M_I a demonstrat faptul că varianta V₇ a redus după 3 zile numărul de spori din mierea infestată, de la 7 spori/câmp la o medie de 0,9 spori/10 câmpuri microscopice la suprafață și la o medie de 0,8 spori/10 câmpuri microscopice în profunzime, după prima administrare, comparativ cu Martor M_I, la care s-a evidențiat o medie de 9,7 spori/10 câmpuri microscopice la suprafață și o medie de 2 spori/10 câmpuri microscopice în profunzime.

Martorul M_{II} a prezentat după 3 zile de la prima administrare o medie de 1,9 spori/10 câmpuri microscopice la suprafață și o medie de un spor/10 câmpuri microscopice în profunzime, valori apropiate cu cele obținute la extractele materii prime. După a doua administrare, Varianta V₇ a prezentat după 8 zile de la momentul T₀ o medie de 1,25 spori/10 câmpuri microscopice.

Martorul M_{II} după 8 zile a prezentat o medie de 3,7 spori/10 câmpuri microscopice, Martorul M_I o medie de 2,7 spori/10 câmpuri microscopice, iar extractele o medie cuprinsă între 1,5 și 3,4 spori/10 câmpuri microscopice.

De menționat că V₇ a prezentat valoarea cea mai mică de spori/câmp, cu o medie de 1,25 spori/10 câmpuri microscopice, la doza de 10 ml/l sirop, având efectul antiparazitar cel mai mare.

RO 130212 B1

Eficiența variantei V₇ ca formulă antiparazitară a fost superioară extractelor individuale (efect datorat sinergismului principiilor biologic active din compoziție) și față de Mu, ceea ce justifică selectarea acesteia ca variantă de lucru antiparazitară.

Stabilirea dozei de administrare a variantei finale de produs nose-api V₇ ce face obiectul prezentei invenții, utilizând modelul „*in vitro*” a mierii infestate natural

Stabilirea dozei de administrare pentru varianta de produs apifitoterapeutic V₇ s-a efectuat pe 10 probe de miere (60 g) infestate natural, cu o medie de 7 spori/câmp, în doze crescânde de la 0,1 ml până la 1 ml. Efectele de inhibare a multiplicării sporilor de *Nosema spp.* au fost evidențiate după 24 h la doza de 0,3 ml (0 spori determinați) comparativ cu lotul M₁ (7 spori). După 5 zile s-au înregistrat valori de un spor/câmp pentru doze de peste 0,3 ml, comparativ cu M₁ (7 spori/câmp). După 18 zile de la inițierea testării „*in vitro*” a variantei V₇ s-a constatat că, începând cu dozele de 0,3 ml până la 1 ml, reducerea fost totală, ajungând la 0 spori/câmp, comparativ cu M₁, cu 7 spori/câmp (tabelul 5).

Testarea „in vitro” pentru stabilirea dozei de administrare a variantei V₇ pe 10 probe de miere infestată natural, comparativ cu M₁

Tabelul 5

Proba/	*P ₁	*P ₂	*P ₃	*P ₄	*P ₅	*P ₆	*P ₇	*P ₈	*P ₉	*P ₁₀	*P ₁₁
T0											
Miere (g)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
Nr. spori/câmp	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
Tip Na (a)/Nc (c)	a=c	a-c ¹	c ¹	c ¹	a ¹	a-c ¹	a-c ¹	a=c	a-c ¹	a-c ¹	a=c
V7 (ml)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	-
T1 (după 1 zi)	3	3	0	3	3	0	0	1	1	1	1
	a=c	a-c ¹	c ¹	a ¹ -c	a	a-c ¹	a-c ¹	a=c	a-c ¹	a=c	a=c
T2 (după 5 zi)	6	3	1	1	1	1	5	1	4	0	7
	a	a	a ¹ -c	a	a	a=c	a	a	a	-	a=c
T3 (după 6 zi)	3	2	2	2	1	2	2	1	0	0	7
	a	a	a ¹ -c	a	a	a=c	a	a	-	-	a=c
T4 (după 7 zi)	3	2	1	1	2	1	1	1	1	0	7
	a ¹ -c	a=c	a	a=c	a=c	a=c	a	a	-	a=c	a=c
T4 (după 18 zi)	4	3	0	0	0	0	0	1	0	0	7
	a-c ¹	a=c	-	-	-	-	-	a	-	-	a=c

*P - nr. proba, Na (*Nosema apis*), Nc (*Nosema ceranae*) t număr crescut

Aceste experimente cu doze progresive utilizând formula apifitoterapeutică V₇, de la 0,1 ml la 1 ml, au demonstrat că doza minimă eficientă a formulei a fost 0,3 ml, după 18 zile de la începerea experimentului. Cercetările pentru stabilirea eficienței și dozajul acestei formule servesc și pentru stabilirea dozei de administrare a variantei selecționate „*in vivo*” pe familiile de albine, în ambele variante sirop miere/apă (1:1) și sirop zahăr/apă (1:1).

În prima etapă s-a stabilit o concentrație minimă necesară pentru formula V₇ de 5 ml/l sirop și respectiv 5 ml/kg miere.

RO 130212 B1

1 În etapa următoare s-au testat diferite concentrații (10 ml și 45 ml) de produs apifitoterapeutic V₇ pe un amestec de 1/1 sirop zahăr/ sau miere.

3 După primele 3 zile de administrare a produsului V₇ în sirop de miere infestată s-a constatat că sunt eficiente „*in vitro*” concentrațiile de 15 ml, 30 ml, 45 ml. Acestea au redus numărul de spori de la 3 spori/câmp la 2 spori/câmp după 3 zile, comparativ cu M_{II}, la care s-a menținut numărul de 7 spori/câmp.

7 După a doua administrare, după un interval de 3 zile, s-a redus numărul de spori până la un spor/câmp, comparativ cu M_{II}, la care s-a redus numărul de spori la 2 spori/câmp.

9 După 13 zile de la prima administrare, la varianta V₇ și respectiv la M_I, s-a constatat reducerea numărului de spori de la 3 la un spor/câmp pentru V₇, comparativ cu M_{II}, care a prezentat același număr cu numărul de spori de la M_I (7 spori/câmp).

11 Rezultatele experimentului demonstrează că „*in vitro*” concentrația eficientă a fost cuprinsă între 10 și 15 ml/l sirop/kg miere. Condițiile de mediu au fost controlate, experimentele efectuându-se la temperatura de 28°C și umiditatea H 37,2%.

15 *Stabilirea dozei de administrare a variantei de produs final Noseapi v7 ce face obiectul prezentei invenții, pe baza modelului „in vivo”, utilizând familii de albine și administrarea ei sub formă de miere/apa (1:1) și sirop de zahăr/apă (1:1)*

17 În cadrul experimentului au fost selectate albine clinic sănătoase, divizate în 2 loturi (Experimental și Martor), izolate între ele. Lotul experimental a fost hrănit ad libitum (la discreție) cu miere infestată cu 2-8 spori/câmp/g cu *N. apis* și *N. ceranae*, iar lotul de control M a primit miere neinfestată (fără spori).

21 Gradul de infestare al mierii a fost determinat pe baza unui algoritm complex formulat în conformitate cu recomandările OIE.

23 Vârsta albinelor utilizate în infestația experimentală a fost de 10 zile, acestea fiind păstrate la temperatura de 30 ± 3°C, identice pentru ambele loturi de albine și cazate în cuști Foti individuale. La 10 zile (T₁) de la debutul experimentului (T₀) au fost evaluate ambele loturi prin cuantificarea numărului de albine vii și moarte, procentul de mortalitate, numărul de spori și gradul de infestație.

29 Probele de albine din ambele loturi au fost examinate pentru determinarea și numărarea sporilor prin recoltarea a câte 10 abdomene de albine și mojararea acestora cu câte 10 ml de apă distilată. Numărarea sporilor s-a efectuat pe hemocitometrul Burkner - Turk, la mărimea x 400. Diferențierea tipurilor de spori din cele două specii de *Nosema spp.* s-a efectuat orientativ microscopic, pe baza caracterelor morfologice a acestora, diferențiere morfologică care a determinat suspiciunea existenței celor două specii de *Nosema* (*Nosema apis* și *Nosema ceranae*).

35 În urma examinării la momentul T₁ după 10 zile de la debutul experimentului s-a evaluat efectul terapeutic prin compararea rezultatelor obținute în cele 2 loturi (tabelul 6).

39 *Evoluția infestației cu Nosema spp. și gradul de infestare al probelor analizate*
41 *din lotul experimental la momentul T₁ (la 10 zile)*

Tabelul 6

Grupa	Starea Familiei	Gradul de infestație după 10 zile (momentul T ₁)				Suspiciune Nosema tip N. a/N .c.	Mortalitate moment Tt (%)	Dg	Albine (40 buc) Vii/ moarte
		F. slabă (1-2)	Slabă (2-10)	Medie (11-20)	Masivă ≥21				
1	Clinic sănătoase	-	+	-	-	N.c.	*	Poz	18/22
2	Clinic sănătoase	+	-	-	-	N. a	**	Poz	29/11
3	Clinic sănătoase	-	-	-	+	N.a	**	Poz	25/15
4	Clinic sănătoase	-	-	-	-	-	*	Neg	14/26

RO 130212 B1

Tabelul 6 (continuare)

Grupa	Starea Familiei	Gradul de infestație după 10 zile (momentul T1)				Suspiciune Nosema tip N. a/N .c.	Mortalitate moment Tt (%)	Dg	Albine (40 buc) Vii/ moarte
		F. slabă (1-2)	Slabă (2-10)	Medie (11-20)	Masivă ≥21				
5	Clinic sănătoase	-	-	-	-	-	**	Neg	22/18
6	Clinic sănătoase	+	-	-	-	N.c.	**	Poz	19/21
7	Clinic sănătoase	+	-	-	-	N. a/N .c.	**	Poz	30/10
8	Clinic sănătoase	+	-	-	-	N. a/N .c.	**	Poz	33/7
9	Clinic sănătoase	-	-	-	-	-	*	Neg	6/34
10	Clinic sănătoase	+	-	-	-	N.c.	*	Poz	19/21
11	Clinic sănătoase	-	+	-	-	N. a/N .c.	*	Poz	16/24
12	Clinic sănătoase	-	-	-	+	N. a/N .c.	**	Poz	24/16
13	Clinic sănătoase	-	-	-	-	-	*	Neg	5/35
14	Clinic sănătoase	-	-	+	-	N. a/N .c.	**	Poz	27/13
15	Clinic sănătoase	+	-	-	-	N. a/N .c.	**	Poz	22/18
16	Clinic sănătoase	-	-	-	+	N.c.	*	Poz	17/23
17	Clinic sănătoase	-	-	-	-	-	*	Neg	9/31
18	Clinic sănătoase	-	-	-	-	-	*	Neg	5/35
Total grupe pozitive (%)		6 (33%)	2 11%	1 (6%)	3 (17%)	12 67%			
Total grupe negative						6 33%			

N. a = *Nosema apis*; N. c = *Nosema ceranae*; * < 50% mortalitate; ** 50-80% mortalitate; ***81-100% mortalitate

Gradul de infestație determinat prin numărarea sporilor a fost următorul: infestație foarte slabă 33%, infestație slabă 11%, infestație medie 6% și infestație masivă 17%.

Eficiența terapeutică a formulei apifitoterapeutice Nose-API₇ la momentul T₂ după 20 zile de la debutul experimentului

Tabelul 7

Grupa	STAREA FAMILIEI (moment T0)	Gradul de infestație la momentul T2 (20 zile)				Suspiciune Nosema tip N. a./N. c.	Mortalitate moment T ₁ (%)	Dg	Albine (40 buc) Vii/ moarte
		F.slabbă (1-2)	Slabbă (2-10)	Medie (11-20)	Masivă >21				
1	Clinic sănătoase	+	-	-	-	N.c	**	Poz	25/15
2	Clinic sănătoase	-	-	-	-	N.c	**	Neg	30/11
3	Clinic sănătoase	-	-	-	-	-	**	Poz	30/10
4	Clinic sănătoase	-	+	-	-	N.a	*	Neg	18/22
5	Clinic sănătoase	-	-	-	-	-	**	Neg	24/26
6	Clinic sănătoase	-	-	-	-	-	**	Neg	21/19
7	Clinic sănătoase	-	-	-	-	-	**	Neg	32/8
8	Clinic sănătoase	-	-	-	-	-	**	Neg	35/5
9	Clinic sănătoase	-	-	-	-	-	*	Neg	6/34
10	Clinic sănătoase	-	-	-	-	N.c.	***	Poz	4/36
11	Clinic sănătoase	-	-	-	-	N.a/N.c	***	Poz	2/38
12	Clinic sănătoase	-	-	-	-	N.a/N.c	***	Poz	9/31

Tabelul 7 (continuare)

Grupa	STAREA FAMILIEI (moment T ₀)	Gradul de infestație la momentul T ₂ (20 zile)				Suspiciune Nosema tip N. a./N. c.	Mortalitate moment T ₁ (%)	Dg	Albine (40 buc) Vii/ moarte
		F.slabă (1-2)	Slabă (2-10)	Medie (11-20)	Masivă >21				
13	Clinic sănătoase	-	-	-	-	-	*	Neg	30/10
14	Clinic sănătoase	-	-	-	-	N.a/N.c	**	Poz	11/29
15	Clinic sănătoase	+	-	-	-	N.a/N.c	**	Poz	15/25
16	Clinic sănătoase	-	-	-	-	N.c	***	Poz	6/34
17	Clinic sănătoase	+	-	-	-	-	*	Poz	27/13
18	Clinic sănătoase	-	-	-	-	-	**	Neg	11/29

N. a = Nosema apis; N. c = Nosema ceranae, * < 50% mortalitate, ** 50-80% mortalitate, ***81-100% mortalitate

Experimentul a demonstrat după prima fază capacitatea mierii infestate cu spori de *Nosema spp.* de a reproduce parazitoza în condiții de laborator în proporție de 67% după 10 zile și de 78% după 20 zile. Administrarea formulei V₇ protejează albinele, astfel încât după 20 zile, la momentul T₂, după 3 administrări de produs, doar 22% dintre albine au fost diagnosticate pozitiv, cu infestație slabă (grupa 3) și foarte slabă (grupa 1) (tabelul 7).

Protecția albinelor a fost realizată în proporție de 78% la lotul experimental V₇, gradul de infestație la albinele diagnosticate pozitiv fiind foarte redus după 3 administrări de 10 ml/kg miere. Lotul netratat a fost diagnosticat pozitiv (78%), cu grad de infestație ridicat (5 grupe) și cu grad de infestație slabă (2 grupe).

Formula apifitoterapeutică NOSE-API V7 este eficientă „*in vivo*” (asigură protecția albinelor) în condiții de laborator pe albine infestate artificial cu miere ce conține 2-8 spori de *Nosema spp.* câmp, după minim 3 administrări din concentrația 10 ml/kg miere.

Testarea clinică a produsului apifitoterapeutic NOSE-API V₇

Testarea clinică a produsului apifitoterapeutic NOSE-API V₇ a fost efectuată în teren prin colaborare cu apicultori voluntari. În derularea studiului clinic s-a ținut cont de reglementările UE incluse în „Regulile de Bună Practică în studiul clinic la animale” și de Protocolul prestabilit, care descrie activitățile specifice.

Au fost incluse în studiul farmacologic familii de albine aparținând unor stupini din jurul Bucureștiului și din 13 județe ale țării. Selecția s-a făcut în baza diagnosticului de laborator, consemnat în buletinul de analiză. Diagnosticul a fost efectuat pe probe variate furnizate de apicultori: albine vii sau moarte, fagure cu/sau fără puiet, polen, miere, păstură. Algoritmul de diagnostic în cazul albinelor vii sau moarte a inclus: examen morfoclinic și anatomopatologic, examen parazitologic extern și intern, examen micologic și citologic, examen virusologie. Metodologia de diagnostic s-a axat în principal pe recomandările OIE. (Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2008).

Pentru o corectă monitorizare a eficacității produsului NOSE-API V₇ asupra infecțiilor provocate de *Nosema ssp.* a fost cuantificat gradul de infestare al familiilor de albine, acestea fiind definite după acest parametru ca având grad înalt, mediu sau slab de infestare (tabelul 8).

RO 130212 B1

Corelații clinice și paraclinice în cadrul lotului destinat evaluării
farmacologic a produsului NOSE-API V₇

Tabelul 8

Total stupini	Buletin de analiză	Lot studiu clinic	Diagnostic clinic Grad de infestație (T0)	Diagnostic de laborator Nosema spp		Infecții asociate
	localizare stupină	numărul familiilor de albine afectate de nosemoză		Nosema apis	Nosema ceranae (Suspiciune)	
1	385 IF	14	nosemoză N+	da	-	-
2	387 IF	10	nosemoză N+	da	-	da
3	388 IF	35	nosemoză nosemoză N+++	da	-	da
4	457 IF	30	nosemoză nosemoză N+++	da	-	da
5	460 IF	40	nosemoză N+++	da	-	-
6	464 IF	10	nosemoză N+++	da	da	da
7	476 B	9	nosemoză N+++	da	-	-
8	498 B	40	nosemoză N+++	da	-	-
9	502 GR	10	nosemoză N+++	da	-	-
10	511 IF	42	nosemoză N+++	da	-	da
11	513 TR	40	nosemoză N+	da	da	-
12	514 IF	25	nosemoză N++	da	-	-
13	525 IF	20	nosemoză N++	-	da	-
14	539 B	85	nosemoză N+	da	-	da
15	542 VN	62	nosemoză N+	da	da	-
16	552 TR	130	nosemoză N+++	da	-	da
17	559 DB	72	nosemoză N++	da	da	da
18	563 IF	43	nosemoză N+++	da	da	da
19	573 TL	183	nosemoză N+	da	-	da
20	578 DB	74	nosemoză N+++	da	da	da
21	580 AR	4	nosemoză N++	da	da	da
22	586 PH	110	nosemoză N++	da	-	da
23	603 IF	25	nosemoză N++	da	-	-
24	604 If	28	nosemoză N++	da	da	-
25	606 If	75	nosemoză N+++	da	-	-
26	607 IF	40	nosemoză N++	da	-	-
27	614 IF	200	nosemoză N+	-	da	-
28	615 GR	10	nosemoză N+++	da	-	da
29	616 IF	10	nosemoză N+++	-	da	-
30	625 IL	23	nosemoză N+++	-	da	-
31	693 GR	72	nosemoză N++	da	da	da
32	703 IL	80	nosemoză N+++	da	-	da
33	704 IF	48	nosemoză N+++	da	-	-
34	708 B	5	nosemoză N+++	da	da	da
35	713 BZ	15	nosemoză N+++	da	-	da
36	720DB	35	nosemoză N+++	da	-	da
37	728 DB	20	nosemoză N+++	da	-	da
38	739 IF	100	nosemoză N+++	da	-	da
39	746 IF	45	nosemoză N+++	da	-	da
40	749 IL	20	nosemoză N+++	da	-	-
41	754 IF	50	nosemoză N+++	da	-	-
42	755 IF	150	nosemoză N+++	da	-	-
43	767 IS	160	nosemoză N++	da	da	da
44	877 IF	170	nosemoză N++	-	da	-
	TOTAL famiii de albine	2469				

Nosemoză (N +) - infestație slabă; (N++) - infestație medie; N (+++) - infestație mare

RO 130212 B1

1 (frecvent bacili, suspiciune de loca) (col Gram) (Ob (preparat proaspăt) (Ob x 40) x 100)

2 Pentru monitorizarea infestației cu *Nosema spp.* și pentru aprecierea eficienței
3 produsului terapeutic NOSE-API V₇ au fost selecționate ca Lot Martor câte 5 familii de albine
4 din fiecare stupină, netratate, menținute în aceleași condiții de întreținere și după același
5 protocol verificate în aceeași perioadă ca și loturile supuse studiului farmacologic.

6 Tratamentul s-a făcut prin administrarea produsului NOSE-API V₇ în sirop de zahăr
7 pe o durată de 5-7 zile, în funcție de gradul de infestare în doză de 10 m/L de sirop,
8 administrându-se câte 200-250 ml sirop medicamentat/familie de albine.

9 Efectul terapeutic general al produsului apifitoterapeutic NOSE-API V₇ a fost
10 manifestat prin dispariția semnelor clinice de boală, diminuarea accentuată a gradului de
11 infestație și prin alte manifestări la nivelul familiei de albine (dezvoltarea cuibului de puiet,
12 puiet compact, stimularea creșterii ponteii mătcii etc).

13 Legat de aprecierea tolerabilității produsului, la sfârșitul perioadei de administrare a
14 tratamentului cu produsul apifitoterapeutic NoseApiV₇, examenele de laborator au
15 demonstrat eficiența terapeutică a produsului, iar la albine nu s-au constatat cazuri de refuz
16 al hranei, manifestări nervoase sau digestive, cazuri de intoxicație, devieri de comportament
17 ale albinelor lucrătoare, modificări negative ale ponteii mătcii, modificări ale numărului de
18 celule de puiet. Tratamentul nu a influențat negativ capacitățile de cules și comportamentul
19 acestora în timpul culesului.

21 *Eficiența tratamentului cu produsul apifitoterapeutic NOSE-API V₇*

Tabelul 11

23 Timpul	24 Număr stupini testate	24 Număr stupini vindecate	24 Număr stupini cu infestație slabă (N+)	24 Număr stupini cu infestație medie (N++)	24 Număr stupini cu infestație mare (N+++)
27 T0	44	0	7 (16%)	11 (25%)	26 (59%)
28 T1(după 5 zile)	44	33 (75%)	6 (14%)	3 (6,82%)	2 (4,55%)

29 Din tabelul 11 se constată o scădere a numărului de stupini cu infestație slabă, de
30 la 16 la 14%, a celor cu infestație medie de la 25 la 6,82% și a celor cu infestație mare de
31 la 59 la 4,55%. Aceasta dovedește cu atât mai mult efectul antiparazitar „*in vivo*” prin
32 reducerea în special a numărului de stupini cu infestație medie și mare. Respectarea
33 protocolului terapeutic, a duratei minime a tratamentului și monitorizarea infecțiilor asociate
34 nosemozei poate duce la un efect terapeutic ce poate depăși procentul de 82% evidențiat
35 prin testările „*in vitro*” prezentate în fazele anterioare.

RO 130212 B1

Revendicare

1

Produs fitoterapeutic pentru tratamentul și prevenirea nosemozelor la albine, **caracterizat prin aceea că**, are în compoziție: 5-30% în greutate tinctură de propolis, 10-25% în greutate extract hidroalcoolic de busuioc, 10-25% în greutate extract hidroalcoolic de frunze de nuc, 10-20% în greutate extract hidroalcoolic de cimbrisor, 10-25% în greutate extract hidroalcoolic de pelin, 15-30% în greutate extract hidroalcoolic de roiniță și 0,1-0,4% în greutate vitamina C.

3

5

7

(51) Int.Cl.

A61K 39/36 (2006.01),

A01K 51/00 (2006.01)

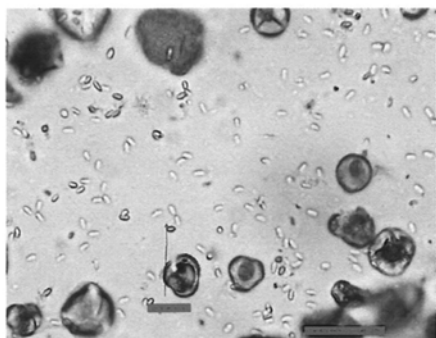


Fig. 1

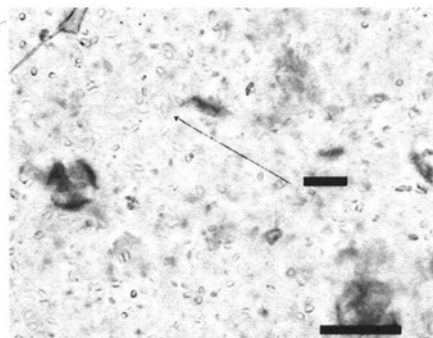


Fig. 2

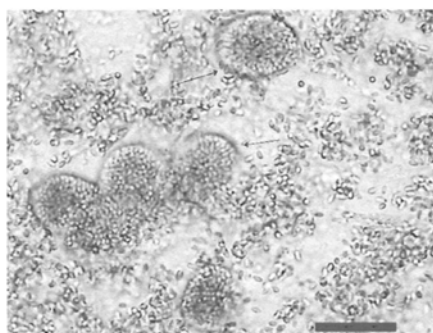


Fig. 3

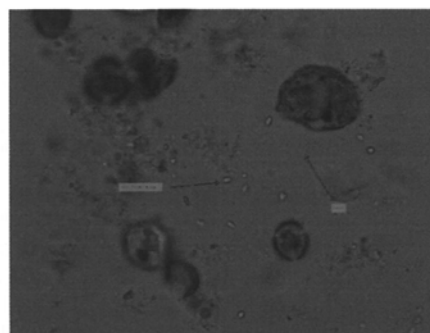


Fig. 4

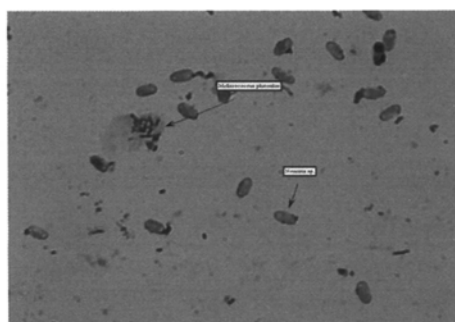


Fig. 5

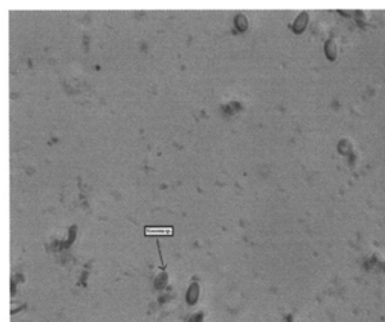


Fig. 6



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 10/2022