



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2014 00113**

(22) Data de depozit: **14/02/2014**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **26/02/2021** BOPI nr. **2/2021**

(41) Data publicării cererii:  
**28/08/2015** BOPI nr. **8/2015**

(73) Titular:  
• **UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE  
ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ A BANATULUI  
"REGELE MIHAI I AL ROMÂNIEI" DIN  
TIMIȘOARA, CALEA ARADULUI NR. 119,  
TIMIȘOARA, TM, RO**

(72) Inventatori:  
• **MEDERLE NARCISA, STR. PALMIERILOR  
NR. 20, TIMIȘOARA, TM, RO;**  
• **MORARIU SORIN, STR. SZENTES NR. 24,  
AP. 2, DUMBRĂVIȚA, TM, RO;**

• **DĂRĂBUȘ GHEORGHE, STR.FELIX  
NR.11, ET.2, AP.10, TIMIȘOARA, TM, RO;**  
• **BOGDAN ALEXANDRU,  
STR. ZAMBILELOR NR. 8, BL. 62, AP. 3,  
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **CRĂCIUN CĂTĂLIN,  
COMUNA GÂRLA MARE, MH, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**RO 122337 B1; DR. K. CSEDO,  
"PLANTELE MEDICINALE ȘI  
CONDIMENTARE", SZERKESZTETTE,  
1980**

(54) **SUPLIMENT ALIMENTAR DIN PLANTE, UTILIZAT  
ÎN PREVENIREA ȘI COMBATEREA NOSEMOZEI LA ALBINE**



# RO 130489 B1

1           Invenția de față se referă la un supliment alimentar destinat prevenirii și combaterii  
nosemozei produse de *Nosema apis* și, mai nou, *Nosema ceranae* la albine, precum și ia  
3 utilizarea acestuia.

5           Importanța și implicarea albinelor în ecosistemele naturale, în culturile agricole și,  
implicat în sănătatea omului, sunt cunoscute din vechi timpuri, în întreaga lume. Datorită  
7 strânsei legături dintre insectele polenizatoare și securitatea alimentară globală, orice declin  
în domeniul creșterii albinelor, alături de pierderea altor polenizatori, trebuie să îngrijoreze  
autoritățile și să stimuleze cercetarea în domeniul patologiei apicole.

9           Parazitozele albinelor și răspândirea acestora în toată lumea reprezintă una din cele  
mai serioase probleme care afectează apicultura modernă din zilele noastre. Lupta împotriva  
11 bolilor parazitare ale albinelor necesită folosirea unor tehnici de diagnostic și aplicarea unor  
tratamente, care trebuie să fie în concordanță cu informațiile despre biologia parazitului și  
13 a gazdei.

15           Una dintre bolile parazitare importante ale albinelor este nosemoza, o parazitoză  
produsă de *Nosema apis* și *Nosema ceranae*, care afectează albinele lucrătoare; determină  
diaree și mortalitate, aspecte ce conduc la apariția unui declin impresionant și progresiv în  
17 familiile afectate, remarcabile fiind atât scăderea numărului de albine, cât și diminuarea  
severă a producțiilor.

19           Din anul 1909, când Enoch Zander descria pentru prima dată sporii *Nosemei apis*,  
cauza îmbolnăvirii albinelor adulte, parazitul s-a răspândit în toată lumea ca agent patogen  
21 al albinei *A. mellifera*.

23           Dacă până în 2005 se vorbea doar despre *Nosema apis* ca fiind agentul cauzator al  
nosemozei albinelor, odată cu identificarea în Spania a lui *Nosema ceranae* diferită față de  
*N. apis*, în ultrastructură și în subunitatea mică (16S) a secvenței de gene ai ARNr, se  
25 raportează tot mai frecvent implicarea noului patogen în focarele de nosemoza diagnosticate,  
cu o patogenitate exacerbată.

27           Atât *Nosema apis* cât și *Nosema ceranae* afectează albinele lucrătoare, cel de-al  
doilea având o patogenitate mult mai mare. Noua specie de *Nosema* este puternic implicată  
29 în depopularea coloniilor de albine. Albinele infestate mor departe de stup, lucru ce  
determină apariția unui declin impresionant și progresiv în familiile afectate, remarcabile fiind  
31 atât scăderea numărului de albine, cât și diminuarea severă a producțiilor.

33           Simptomele caracteristice nosemozei ce trebuie luate în considerare sunt: diareea,  
mortalitatea, depopularea, dispariția totală a coloniilor de albine din stup. În familiile infestate,  
aceste simptome nu se întâlnesc singure ci, de cele mai multe ori, sunt asociate.

35           În prezent, devine o evidență îngrijorătoare faptul că *Nosema ceranae* este un parazit  
emergent al *Apis mellifera* cu un efect patogen considerabil asupra aibinei ca individ, dar și  
37 asupra coloniei de albine. Singură sau în combinație cu alți factori care acționează sinergic  
(lipsa culesului, condițiile de întreținere, efectele încălzirii globale și schimbările climatice),  
39 *N. ceranae* poate exercita o creștere a patogenității care culminează cu apariția CCD.

41           *Nosema spp.* sunt microsporidii, paraziți unicelulari, care trăiesc sub o formă  
sporulată (formă de rezistență) și una, vegetativă. Unul dintre criteriile de diferențiere a  
speciilor genului *Nosema* este cel morfologic și acesta include evaluarea dimensiunilor,  
43 forma sporilor, structura internă și externă a acestora.

45           Viața nosemelor începe cu sporii care pătrund în albină odată cu hrana. În condiții  
optime, de la ingestia sporilor la producerea de noi spori trec doar 48...80 h. Sporii rezistă  
mai mult de un an în stare de latență, în depozitele de fecale, pe fagurii murdăriți dintr-o  
47 colonie, trecând astfel, dintr-un sezon în următorul. Una dintre sursele principale de infestație

# RO 130489 B1

este reprezentată de fagurii murdăriți cu fecale. Cu toate că iernarea albinelor pe faguri	1
contaminați crește mult riscul declanșării nosemozei în primăvară, totuși, nu se declanșează	
întotdeauna simptomatologia specifică nosemozei. Astfel, în colonia de albine nu este sufi-	3
cientă doar prezența sporilor pentru declanșarea unei boli cu evoluție epizootică.	
Transmiterea bolii și declanșarea fenomenelor clinice sunt influențate de intervenția	5
mai multor factori, dintre care, un rol important în epidemiologie îl are intervenția omului, prin	
practicile apicole efectuate nerațional: păstrarea în stupină a coloniilor slabe cu rol de	7
rezervor de infecție, intervenții frecvente, uneori nejustificate, în cuibul coloniei de albine, for-	
marea exagerată de roiuri artificiali, mai ales în a doua jumătate a anului, întărirea coloniilor	9
slabe pe seama celor de putere medie, transferarea coloniilor, în prima parte a verii, pe	
faguri contaminați cu spori de <i>Nosema</i> , manoperele de strivire a albinelor, echipamentul	11
folosit pentru hrănirile de iarnă care permite albinelor să între și să se înece în sirop.	
Pătrunderea albinelor bolnave în alte colonii, sursele de apă contaminate cu spori,	13
furtișagul, disponibilitatea proteinelor și statutul proteic al albinelor, bolile infecțioase,	
intoxicațiile (cu nectar sau polen toxic), iernarea pe mană sau pe miere de mană sau pe	15
miere necăpăcită și fermentată (provenită din hrăniri de completare efectuate toamna târziu),	
iernile lungi, fără posibilitatea realizării zborului de curățire, aglomerarea coloniilor pe un	17
spațiu redus și lipsa mătcii în timpul iernii sau prezența în acest timp a unei mătcii	
neîmperecheate, moliile de ceară ( <i>Galleria melanella</i> , <i>Achroea grisella</i> ), trântorii, la care a	19
fost identificată specia <i>N. ceranae</i> atât la formele imature cât și la adulți reprezintă căi de	
transmitere a parazitozei și pot influența, într-o oarecare măsură, evoluția bolii.	21
Fiind enteropatogene, speciile genului <i>Nosema</i> care afectează albinele se dezvoltă	
și se multiplică în celulele tubului digestiv (celulele epiteliale ventriculare). De aceea, evoluția	23
acestor paraziți de la formele sporulate spre cele vegetative pentru a ajunge, ulterior, să	
colonizeze întreg intestinul, este influențată de calitatea hranei albinelor, în special în a doua	25
jumătate a iernii, când albinele încep să devină mai active.	
În țara noastră, creșterea prevalenței nosemozei, identificarea parazitului și la	27
albinele asimptomatice, implicarea speciei <i>N. ceranae</i> în episoadele diareice sau de	
depopulare a coloniilor impun o atenție deosebită a cercetătorilor în prevenirea și controlul	29
acestei parazitoze, cu sublinierea unui aspect important: atenție la reziduurile din produsele	
apicole, cu repercusiuni în sănătatea omului.	31
Fie că este vorba de <i>Nosema apis</i> fie de <i>Nosema ceranae</i> , intervenția terapeutică	
este imperios necesară.	33
Aplicarea „terapii alternative” în detrimentul celei alopate, cu efecte miraculoase	
pentru tratarea diferitelor afecțiuni întâlnite la oameni, a contribuit la extinderea utilizării ace-	35
stor remedii naturiste și în vindecarea afecțiunilor animalelor. Chiar și în zilele noastre, în	
așezările rurale, oamenii folosesc cu succes aceste tratamente neconvenționale pentru com-	37
batarea bolilor animalelor.	
Se cunoaște folosirea în tratamentul nosemozei albinelor a unor produse de sinteză	39
sau biosinteză, aplicate topic sau ca supliment în hrană. Cele mai bune rezultate se obțin	
prin combinarea celor două modalități de administrare, reducând astfel și contaminarea	41
mediului.	
Din cei peste 200 de compuși de sinteză testați, doar fumagilina și câțiva compuși	43
organici ai mercurului au dat rezultate acceptabile. Compușii organici ai mercurului au o	
eficacitate redusă asupra parazitului și sunt mult mai toxici pentru albine decât fumagilina.	45
Fumagilina este un antibiotic, izolat din culturile de <i>Aspergillus fumigatus</i> , obținut pentru	
prima dată de HANSON și ELBE în 1949, dar proprietățile sale amoebocide au fost studiate	47

# RO 130489 B1

1 inițial pe protozoarele parazite la om. Deși efectul curativ al fumagilinei administrată în sirop  
de zahăr diminuează cu timpul, medicamentul își păstrează eficacitatea după consum și  
3 depozitarea în faguri, pe tot parcursul iernii. Sporii rămân, însă, neafecțați de fumagilină, pre-  
zența și depozitarea acestora în fecale constituind surse de infecție pentru albine în  
5 primăvară.

Astfel, în condițiile obținerii unor produse curate ale stupului (miere, lăptișor de matcă  
7 etc), conform cerințelor UE și ca urmare a măsurilor agricole europene ce prevăd sporirea  
familiilor de albine în țara noastră este obligatorie renunțarea la terapiile alopate ce lasă  
9 reziduuri în aceste produse și găsirea unor remedii naturale, care să fie eficiente, dar care,  
în aceeași măsură, să nu dăuneze stupului.

11 Invenția propusă se încadrează în aceste deziderate europene, dovedindu-se  
eficientă în reducerea infestației cu *Nosema spp.* și fără efecte secundare. Ea se bazează  
13 pe utilizarea principiilor active din diferite plante medicinale și pe acidifierea conținutului  
tubului digestiv al albinelor cu oțet de mere.

15 Problema pe care o rezolvă invenția constă în realizarea preparatului, a cărui  
eficacitate a fost testată experimental, în stabilirea componentelor și rapoartelor de asociere,  
17 ceea ce conduce la un supliment alimentar cu palatabilitate și eficacitate crescute.

Invenția se referă, în primul rând, la obținerea suplimentului alimentar pentru tratarea  
19 nosemozei la abine.

Conform acesteia, suplimentul este constituit din:

- 21 - 50% sirop de zahăr 1/1;
- 50% infuzie de plante.

23 Siropul de zahăr se prepară 1/1 cu infuzia de plante descrisă mai jos:

25 - 33,33% urzică (*Urtica dioica*), cu următoarea compoziție chimică: mucilagii, saponozide,  
ulei volatil, flavonozide, glicozide, taninuri, antioxidanți, vitaminele A, C, D, E și K,  
27 lecitină, calciu, magneziu, zinc, potasiu, fosfor, dar și 3-beta-sitosterol și steroli similari,  
alcool fenil propilic, cerarnide, acizi grași, dioli monoterpenici, leukotriene, histamină;

29 - 33,33% mușețel (*Matricaria chamomilla*), care conține: uleiuri volatile (hidrocarburi  
sesquiterpenice, alcooli sesquiterpenici, oxizi sesquiterpenici, cumarine), principii amare  
sesquiterpenice (proazulene), flavonozide (glicozide de apigenină, luteolină, kempferol și  
31 derivați metoxilați), glucide, vitamine (B1, C, carotenoizi), colină, minerale (calciu, fier, zinc,  
siliciu, zirconiu, molibden, cupru, fosfor, potasiu), acizi grași (acid oleic, linoleic, palmitic,  
33 stearic, cerotic), acizi fenolici (clorogenic, cafeic, salicilic, siringic, vanilic);

35 - 8,33% coada șoricelului (*Achillea millefolium*), ce conține: ulei eteric, acizii achileic,  
formic, azeic, aconitic, ascorbic, folic, probionic, valerianic, palmitic, stearic, miristic, oleic,  
37 linoleic, succinic, urme de acid salicilic, cafeic, alcool etilic metilic, flavone, maltoză, zaha-  
roză, glucoza, arabinoză, galactoză, dextine, aminoacizi, proteine, taninuri, substanțe  
anorganice, cu elementele chimice fier, mangan, zinc, cupru, cadmiu, nichel, siliciu, calciu;

39 - 8,33% cimbru (*Satureja hortensis*), cu următoarea compoziție chimică: ulei volatil  
(care, în funcție de chemotip, are drept component principal terpinen-4-ol,  $\gamma$ -terpinen, cis-  
41 sabien hidrat, linalol sau *p*-cimen); hidrocarburi terpenice (*p*-cimen,  $\alpha$ - și  $\beta$ -pinen, camfen,  
mircen, limonen, caren, triciclen, fenchen, *p*-mentan, menten, sabinen, terpinolen,  $\beta$ -  
43 felandren,  $\alpha$ -felandren, cariofilen, cadinen, terpinene,  $\alpha$ -tujona); compuși oxigenați (1,8-  
cineol, 1-borneol, geraniol, nerol, timol, citronelol, alcool fenchilic, pinocarveol, farnesol,  
45 nerolidol, carvacrof, pinocarvonă, acetat de bornil, acetat de linalil, acetat de geraniol, acetat  
de neril, valerianat de linalil terpinen-4-ol, octan-1-en-3-ol, eugenol, metil eugenol, 1-ter-  
47 pineol, dihidrocarveol, verbenol, *p*-cimol), derivați flavonici (luteolina și glicozide ale luteolinei  
și apigeninei, flavone di-, tri-, tetrametoxilate); acizi polifenolcarboxilici (acid clorogenic, acid  
49 rozmarinic, acid ferulic, acid cafeic), ceruri și triterpene (acid ursolic și oleanolic), un principiu  
amar;

# RO 130489 B1

- 8,33% sunătoare (*Hypericum perforatum*), care are în componență: naftodiantrone (hipericină, pseudohipericină, protohipericină), ulei esențial (alcătuit din  $\alpha$ -pinen și cadinen), flavonozide (hiperozidă, rutozidă, izoquercitrozidă), taninuri, acid cinamic, acid cafeic, acid clorogenic, hiperforină, xantone, carotenoide, rezine, substanțe minerale, vitamine (A, C, K, PP);

- 8,33% mentă (*Menta piperita*) cu compoziția următoare: ulei volatil (mentol 52,6-63,2%, mentonă, mentofuran, hidrocarburi terpenice - pinen, terpine, felandrone, limonen, camfor, fenchen, terpinol, sahinea, cimen, mircen, cadinen) lipide, acizi triterpenici (oleanolic, ursolic), sitosterol, orgocalciferol, amestec de parafine, acizi polifenolcarboxilici (acid cafeic, rosmarinic, clorogenic, ferulic, cumaric), taninuri, flavonoide (hesperitină), glucide (ramnoză, gaiactoză, glucoza, fructoză, zaharoză, rafinoză, stachinoză, verbascoză), carotenoide (radovantină, eripoxantină, violoxantină, carotină), enzime (catalaza, peroxidaza, polifenoloxidaza etc), vitamine (C, D<sub>2</sub>, tocoferoli, PP), săruri minerale (potasiu, calciu, fosfor, magneziu, sodiu, fier, mangan, zinc, bor, cupru, molibden).

Infuzarea se realizează timp de 1 min, în vase ceramice sau metalice emailate sau din inox, după care produsul se strecoară.

Suplimentul alimentar terapeutic se administrează în hrănitor, în doze de 200 ml/colonie în prima zi de tratament și câte 100 ml/colonie la a doua și a treia acțiune terapeutică.

Pentru o eficacitate sporită, invenția se poate aplica prin pulverizare și în interiorul stupului, atât pe pereții acestuia cât și pe rame. Pentru aceasta, preparatului i se adaugă oțet de mere, vin de struguri curat și tinctură de usturoi, după următoarea rețetă:

- 61,54% supliment alimentar natural (descriș mai sus);

- 18,46% oțet de mere;

- 18,46% vin de struguri curat;

- 1,54% tinctură de usturoi.

Tinctura de usturoi s-a obținut prin macerarea a 500 g usturoi zdrobit în 400 mL alcool de 96 volume. Maceratul a fost menținut la frigider timp de 10 zile, perioadă în care a fost omogenizat zilnic, iar la final a fost filtrat, tinctura astfel obținută fiind utilizată imediat.

Doza recomandată pentru pulverizarea unui stup este de 250 ml, cu repetare de două ori la interval de două zile.

Acest produs, ce conține principii active exclusiv naturale, are proprietăți antiinflamatoare, calmante, astringente, antiseptice și antibiotice.

## *Rezultatele studiilor epidemiologice, clinice, terapeutice*

### *și de biologie moleculară susțin prezenta invenției*

Studiile epidemiologice realizate în județele Timiș, Arad și Caraș-Severin au urmărit determinarea prevalenței nosemozei în stupine, corelarea simptomelor cu prezența sporilor de *Nosema* identificați prin microscopie și cu perioada de apariție a acestora.

Probele de examinat au fost recoltate majoritar la sfârșitul lunii februarie, începutul lunii martie, dar și pe toată durata anului. Am ales în principal prima perioadă a anului deoarece, atunci, sunt corelate două aspecte epidemiologice importante - gradul infestației cu *Nosema* și factorii epidemiologici favorabili evoluției bolii. Probele au fost reprezentate de albine moarte, albine sănătoase, faguri și probe de sol din imediata apropiere a stupilor. Din fiecare stupină examinată au fost preluate și înregistrate, informații despre data recoltării, numărul de probe, locația stupinei, condițiile de iernare, simptome de diaree, mortalitate, morbiditate, depopulare sau dispariție.

# RO 130489 B1

1 Pentru stabilirea gradului de infestare cu protozoarul *Nosema spp.* s-a apelat la  
metoda calitativă și examinarea microscopică (fig. 1).

3 Din totalul celor 292 de probe de albine recoltate din stupine localizate în județul  
Arad, 167 (52%) au fost diagnosticate cu nosemoză, prin metoda calitativă.

5 Dintre acestea, 54% au fost reprezentate de colonii de albine asimptomatice,  
fenomen observat pe parcursul sezonului cald. Un număr mare de albine moarte au fost  
7 identificate pe oglinda stupului și pe plăcuța de zbor, în timpul toamnei și al iernii și au repre-  
zentat 30% din cele infestate cu *Nosema spp.* Coloniile de albine depopulate și dispărute au  
9 reprezentat 9%, respectiv 3% din totalul probelor de albine cu nosemoză. Simptomele de  
diaree asociate cu prezența sporilor de *Nosema* au reprezentat 4% din totalul albinelor  
11 pozitive.

13 La probele recoltate din județul Timiș 323 probe, prevalența nosemozei diagnosticată  
prin metoda calitativă a fost de 55%. Din totalul probelor pozitive, 69% nu au prezentat  
simptome de boală, iar 18% au fost colonii moarte. Fenomenul depopulării a fost observat  
15 la 8% dintre coloniile infestate, în timp ce, 4% dintre acestea au dispărut. Asocierea  
simptomelor de diaree cu prezența sporilor de *Nosema* a fost remarcată la 1% din totalul  
17 albinelor pozitive. În județul Timiș, coloniile de albine moarte diagnosticate cu nosemoză au  
fost întâlnite în a doua parte a iernii și la începutul primăverii. La aceste colonii de albine,  
19 simptomele de diaree, au fost asociate cu un înalt grad de infestație cu *Nosema*. Protozoarul  
a fost identificat și la colonii de albine moarte în perioada de toamnă, dar acestea nu  
21 prezentau simptome specifice infecției cu *Nosema*. Boala clinic manifestată prin sindrom  
diareic a fost diagnosticată și confirmată microscopic prin evidențierea sporilor doar în lunile  
23 februarie și martie.

25 În județul Caraș-Severin, stupinele de la care s-au recoltat cele 231 probe au  
prezentat o prevalență a nosemozei de 59%. Coloniile de albine la care au fost prezente  
semnele clinice (diareea) au fost în proporție de 5%, iar procentul coloniilor moarte a fost 39-  
27 48% din coloniile examinate și identificate pozitive la infestația cu *Nosema* au fost asumpto-  
matice. În județul Caraș-Severin, a fost înregistrat un procent de 8 colonii depopulate. Nu au  
29 fost identificate colonii de albine cu sindromul dispariției. La stupinele din județul Caraș-  
Severin, cazurile de mortalitate, depopulare și de diaree au fost constatate iarna și  
31 primăvara. Nosemoză cronică sau subclinică (forma de evoluție ce necesită diagnostic de  
laborator) au fost semnalate, primăvara.

33 O analiză comparativă a rezultatelor obținute în cele trei județe luate în studiu (fig. 2)  
ne permite să subliniem câteva din aspectele importante care se desprind din studiul  
35 epidemiologic al nosemozei albinelor.

37 Declanșarea formei acute de boală, manifestată prin diaree, mortalitate și asociată  
cu prezența sporilor de *Nosema* la nivel înalt de infestație este corelată cu fenomenele  
observate la deschiderea stupului: colonii de albine care au intrat la iernare, puternice, dar  
39 care au murit ulterior într-un procent ridicat; albine căzute de pe faguri; rezerve de hrană  
parțial căpăcită, fermentată și mucegăită. Moartea albinelor, în a doua parte a iernii, într-o  
41 proporție crescătoare în cele trei județe (18%, 30%, respectiv, 39%) a fost acompaniată de  
prezența protozoarului, dar nu întotdeauna a fost clinic prevestită, aspect care ne poate  
43 orienta spre diagnosticul de nosemoză de tip C, în care evoluția este acută și colonia de  
albine moare înainte de apariția simptomelor specifice nosemozei.

45 La coloniile introduse la iernat ca familii puternice, sindromul depopulării coloniilor de  
albine a fost observat la sfârșitul iernii și începutul primăverii, în toate cele trei județe, în  
47 procente foarte apropiate (9%, în stupinele din județul Arad și 8%, în județele Timiș și Caraș-  
Severin). Probele de albine recoltate din aceste colonii au fost infestate cu spori de *Nosema*,

# RO 130489 B1

identificați microscopic. Depopulările masive de pe parcursul iernii pot fi justificate prin prezența protozoarului care determină scăderea longevității albinelor lucrătoare. Pierderile de albine în perioada de vară sunt compensate, într-o oarecare măsură de albinele tinere, nou emerjate, dar această pierdere determină scăderea producțiilor, motivată prin reducerea capacității de ouat datorită infestării mătcii.

Coloniile de albine cu simptome de diaree au fost înregistrate doar în a doua parte a iernii (în lunile ianuarie și februarie), în toate cele trei județe, în procent de 4 (Arad), 5 (Caraș-Severin), respectiv, 1, în județul Timiș. În această perioadă, nosemoza poate evolua clinic datorită strânsei legături cu factorii favorizanți: imposibilitatea efectuării zborului de curățire, creșterea temperaturii din stup, dar și a consumului de rezerve energo-proteice, intensificarea activității în ghemul de iernare.

Absența simptomelor caracteristice urmărite (mortalitate, depopulare, dispariție și diaree) la un număr ridicat de colonii (de la 48%, în județul Caraș-Severin, la 69%, în Timiș), dar la care au fost identificate grade mari de infestare cu spori de *Nosema*, relevă faptul că în evoluția nosemozei intervin o serie de factori intrinseci și extrinseci.

Coloniile infectate cu *Nosema*, dar asimptomatice, joacă un rol foarte important în epidemiologia bolii. Ele pot fi întâlnite pe tot parcursul anului și mențin pericolul izbucnirii unui episod clinic, mai ales în perioada de iarnă, atât în stupină, cât și în afara acesteia, la stupinele învecinate, prin furțișag, roire și dezorientare, sau, pericolul infestării se poate întinde pe sute de km, prin practicarea pastoralului.

Nosemoza este o boală polifactorială, în a cărei patogeneză și evoluție clinică, factorii epidemiologici joacă un rol important. Moartea albinelor într-un procent îngrijorător, semnalat în cele trei județe luate în studiu, absența semnelor clinice caracteristice și confirmarea microscopică a prezenței protozoarului ne-au orientat spre diagnosticul de nosemoză de tip C. Prezentul studiu aduce informații importante pentru specialiști și apicultori, privind prevalența nosemozei care atinge valori asemănătoare în trei județe limitrofe (Caraș-Severin, Timiș, Arad), precum și date referitoare la evoluția clinică, fenomenele depopulării și dispariției coloniilor de albine, în această regiune geografică a țării.

## *Identificarea prin tehnici de biologie moleculară a speciilor de Nosema*

Tehnica PCR este o metodă foarte sensibilă pentru identificarea speciilor, inclusiv pe cele de microsporidii, și permite detectarea parazitului la nivele foarte reduse de infecție. Au fost descrise mai multe tehnici moleculare bazate pe PCR pentru diagnosticul și identificarea *N. apis* și *N. ceranae*, cum ar fi PCR convențional sau duplex, PCR - RFLP, qPCR, PCR multiplex. *N. ceranae* ar putea fi clar separat de congenerul său *N. apis* pe baza secvențelor de gene rRNA de subunitate mică (SSU) și pe caracteristicile ultrastructurale.

Identificarea prin tehnici de biologie moleculară a speciilor de *Nosema* s-a realizat la albinele recoltate din trei județe: Caraș-Severin, Arad și Timiș. Prin metoda calitativă s-a stabilit gradul de infestare (slab/mediu/puternic) al albinelor care, ulterior, au fost supuse tehnicii PCR bazată pe primeni de gene 16S rRNA, urmată de secvențierea ADN-ului pentru a diferenția cele două specii. Probele de albine au fost filtrate, iar suspensia obținută a fost păstrată la -20°C până în momentul analizei moleculare. ADN-ul genomic a fost extras din suspensiile de albine, utilizând kitul FastDNA SPIN.

Rezultatele studiului au relevat identificarea unei singure specii, *Nosema ceranae*, detectată prin PCR și secvențierea ADN-ului, la albinele recoltate din 37 stupine din cele trei județe (690 probe).

# RO 130489 B1

1 Studiile ultimilor ani susțin afirmația că, *N. ceranae* a înlocuit sau este pe cale să-și  
înlocuiască congenerul la nivel global. Poate că doar sensibilitatea la frig a acestei specii  
3 reduce prevalența bolii în arealele cu climă rece.

În ultimii ani, a fost remarcată o creștere a infestației cu paraziți microsporidieni în  
5 diferite regiuni ale României, coloniile de albine aparent sănătoase și puternice devenind  
slabe și, în final, supuse morții. Analiza moleculară a genei SSU-rRNA (16S) a sporilor de  
7 *Nosema*, folosind metoda duplex PCR a dovedit prezența speciei *Nosema ceranae* în 87%  
din probele provenite din stupine localizate în județele Arad, Timiș, Caraș-Severin și Bihor  
9 acestea putând fi răspunzătoare de pierderile de colonii de albine din ultimii ani. Analiza  
moleculară a genei SSU-rRNA (16S) a sporilor de *Nosema* a dovedit prezența speciei  
11 *Nosema ceranae* în patru județe din vestul României.

Apreciind patogenitatea crescută a speciei *Nosema ceranae* versus *Nosema apis*,  
13 se poate afirma că, în fenomenul depopulării familiilor de albine, fenomen semnalat de  
apicultorii din regiunea de sud-vest a țării (în perioada și din județele de unde au fost  
15 recoltate probele), este implicată specia cu patogenitatea cea mai ridicată, infecția cu *N. apis*  
rareori duce la moartea coloniei de albine, evoluând subclinic, de cele mai multe ori; *N.*  
17 *ceranae* este foarte patogenă pentru *A. mellifera*, fiind asociată cu sindromul depopulării  
graduale, cu mortalitățile din toamnă sau din iarnă și cu producții slabe de miere.

19 Combinația de microscopie convențională și secvențierea PCR/ADN a demonstrat  
că este o metodă eficientă pentru diagnosticarea microsporidiei *Nosema ceranae* și pentru  
21 evaluarea prevalenței acestui patogen la albinele melifere din trei județe din sud-vestul  
României (fig. 3, 4).

23 Prezența exclusivă a *N. ceranae* în toate stupinele monitorizate sugerează dominația  
acestei specii și capacitatea sa de a înlocui *N. apis*, de-a lungul timpului, în această regiune  
25 a țării.

## 27 *Testarea eficacității terapeutice a Suplimentului alimentar* 29 *din plante destinat prevenirii și combaterii nosemozei*

Un studiu terapeutic complex a fost realizat la stupinele infestate cu protozoarul  
31 *Nosema spp.*, provenite din șase județe ale țării, din regiuni geografice diferite.

Au fost examinate un număr de 8070 de albine prin metoda calitativă pentru a  
33 determina gradul de infestare, care, ulterior a fost corelat cu prezența/absența semnelor  
clinice (diaree, mortalitate, depopulare).

35 Suplimentul alimentar terapeutic s-a administrat în hrănitor, în doze de 200 ml/colonie  
în prima zi de tratament și câte 100 ml/colonie la a doua și a treia acțiune terapeutică; s-a  
37 aplicat și prin pulverizare, în interiorul stupului, atât pe pereții acestuia, cât și pe rame.

Rezultatele obținute înainte și după tratament au fost prelucrate statistic cu ajutorul  
39 programului SPSS-IBM software. S-au efectuat analize cross-tab și s-a aplicat testul Chi-  
Square.

41 Interpretarea statistică a rezultatelor obținute înainte și după administrarea Suplimentului  
alimentar relevă diferențe semnificative ( $\chi^2 = 926,227$ ,  $p = 0,000$ ), fapt care demonstrează  
43 eficacitatea tratamentului utilizat.

Statistica descriptivă stabilește un procent al eficacității terapeutice a Suplimentului  
45 alimentar de 92, cu tendința spre 100% la loturile de albine diagnosticate cu infestație slabă  
(+) cu protozoarul *Nosema*.

47 Gradul infestării albinelor cu protozoarul *Nosema*, corelat cu localitatea de unde  
provin probele examinate, înainte de administrarea suplimentului alimentar este prezentat  
49 în tabelul 1 și fig. 5.



# RO 130489 B1

Gradul infestării înainte de tratament determinat prin examinare microscopică

Tabelul 1

Nr. crt.	Localitatea	Nivelul infestării				Total
		0	1	2	3	
1	Alios	7	17	22	25	71
		9,9%	23,9%	31,0%	35,2%	100,0%
2	Barateaz	3	7	0	0	0
		30,0%	70,0%	0,0%	0,0%	100,0%
3	Denta	21	42	25	9	97
		21,6%	43,3%	25,8%	9,3%	100,0%
4	Gad	3	8	0	0	11
		27,3%	72,7%	0,0%	0,0%	100,0%
5	Herandăști	60	46	193	137	436
		13,8%	10,6%	44,3%	31,4%	100,0%
6	Hisias	9	11	10	1	31
		29,0%	35,5%	32,3%	3,2%	100,0%
7	Ianova	6	0	0	0	6
		100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%
8	Mierlău	4	0	0	0	0
			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%
9	Balotești	0	8	0	0	8
		0,0%	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%
10	Gârcina	3	7	5	0	15
		20,0%	46,7%	33,3%	0,0%	100,0%
11	Opatia	19	20	22	4	65
		29,2%	30,8%	33,8%	6,2%	100,0%
12	P. Brașov	27	13	0	0	40
		67,5%	32,5%	0,0%	0,0%	100,0%
13	Resița	0	0	10	3	13
		0,0%	0,0%	76,9%	23,1%	100,0%
	Total	162	179	287	179	807
		20,1%	22,2%	35,6%	22,2%	100,0%

Legenda: 1 probă pozitivă sample - 10 infestatie slabă; 2 - ++ infestatie medie albine examinate; 0 - lotul martor; 1 ; 3 - +++ infestatie puternică

# RO 130489 B1

1 Gradul infestării albinelor cu protozoarul *Nosema*, corelat cu localitatea de unde  
 2 provin probele examinate, după administrare suplimentului alimentar este prezentat în tabelul  
 3 2 și fig. 6.

5 *Gradul infestării după tratament determinat prin examinare microscopică*

7 *Tabelul 2*

Nr. Crt.	Localitate	Nivelul infestării		Total
		0	1	
1	Alios	63	8	71
		88,7%	11,3%	100,0%
2	Barateaz	10	0	10
		100,0%	0,0%	100,0%
3	Denta	88	9	97
		90,7%	9,3%	100,0%
4	Gad	11	0	11
		100,0%	0,0%	100,0%
5	Herandasti	409	27	436
		93,8%	6,2%	100,0%
6	Hisias	30	1	31
		96,8%	3,2%	100,0%
7	Ianova	6	0	6
		100,0%	0,0%	100,0%
8	Mierlau	4	0	4
		100,0%	0,0%	100,0%
9	Balotești	8	0	8
		100,0%	0,0%	100,0%
10	Gârcina	13	2	15
		86,7%	13,3%	100,0%
11	Opatia	65	0	65
		100,0%	0,0%	100,0%
12	P. Brașov	40	0	100,0%
		100,0%	0,0%	100,0%
13	Reșița	11	2	13
		84,6%	15,4%	100,0%
Total	Total	758	49	807
		93,9%	6,1%	100,0%

# RO 130489 B1

<b>Bibliografie</b>	1
Alaux C., Folschweiller M., McDonnel C., Besiay D., Cousin Marianne, Dussaubat Claudia, Brunet J., Le Conte I., Pathological effects of the microsporidium <i>Nosema ceranae</i> on honey bee queen physiology ( <i>Apis mellifera</i> ), <i>J. Inv. Pathol.</i> , 2011; 106:380-385.	3 5
Bailey L., Ball BV. Honey bee pathology. Academic Press London; 1991.	
Bailey L., The measurement and interrelationships of infections with <i>Nosema apis</i> and <i>Maipighamoeba mellihcae</i> of honey-bee populations. <i>J. Invert. Pathol.</i> , 2004; 16-21.	7
Botias C., Martin-Hernández R., Meana A., Higes M., "Screening alternative therapies to control Nosemosis type C în honey bee ( <i>Apis mellifera iberiensis</i> ) colonies, 2013, <i>Res Vet Sci.</i> , 95(3), 1041-5.	9 11
Carletto J., Bianchard P., Gauthier A., Schurr F., Chauzat M.P., Ribiere M. Improving molecular discrimination of <i>Nosema apis</i> and <i>Nosema ceranae</i> . <i>J Invertebr Pathol.</i> 2013; 113(1):52-5.	13
Chen Y.P., Evans J.D., Murphy C., Gutell R., Zuker M., Gundensen-Rindal D., Pettis JS. Morphological, molecular, and phylogenetic characterization of <i>Nosema ceranae</i> , a microsporidian parasite isolated from the European honey bee, <i>Apis mellifera</i> . <i>J. Eukaryot Microbiol.</i> , 2009; 56(2): 142-147.	15 17
Cox-Foster D.L., Conlan S., Holmes E., Palacios G., Evans J.D., Moran N.A. A metagenomic survey of microbes în honey bee colony collapse disorder. <i>Science</i> , 2007; 318: 283-287.	19 21
Fries I. <i>Nosema ceranae</i> has infected <i>Apis mellifera</i> Europe in at least 1998 and may be more virulent than <i>Nosema apis</i> . <i>Apidologie.</i> 2007, 38: 558-565.	23
Higes M., Martin-Hernández R., Meana A. <i>Nosema ceranae</i> în Europe: an emergent type C nosemosis. <i>Apidologie</i> , 2010: 41(3):375-392.	25
Klee J., Besana A.M., Genersch E., Gisder S., Nanetti A., Tam D.Q., Chinh T.X., Puerta F., Ruz J.M., Kryger P., Dejair M., Hatjina F., Korpela S., Fries I., Paxton R.J. Widespread dispersal of the Microsporidian <i>Nosema ceranae</i> , an emergent pathogen of the western honey bee, <i>Apis mellifera</i> , <i>J. Invertebr. Pathol.</i> , 2007; 96:1-10.	27 29
Liu TP. The release of <i>Nosema apis</i> spores from the epithelium of the honey bee midgut. <i>J. Apia Res.</i> , 1990;29:221-229.	31
Maggi M., Negri P., Plischuk S., Szawarski N., De Piano F., De Feudis L., Eguaras M., Audisio C., Effects of the organic acids produced by a Sactic acid bacterium in <i>Apis melifera</i> cofony development, <i>Nosema ceranae</i> control and fumagillin efficiency, <i>Vet. Microbiol.</i> , 2010, 187(3-4), 474-83.	33 35
Manualul apicultorului, Asociația crescătorilor de albine din România, ediția a IV-a, București; 1986.	37
Matheson A. World bee health update. <i>Bee World</i> , 1995; 76:31-39.	
OIE Terrestrial Manual. Nosemosis of honey bees, 2008; 2.2.4.	39
Ritter W. Bolile albinelor. Ed. M.A.S.T. București, 2000.	
Vanengeisdorp D., Evans J.D., Saegerman C., Muliin C., Haubruge E., Nguyen B.K., Frazier M., Frazier J., Cox-Foster D., Chen Y., Underwood R., Tarpay DR., Pettis JS. Colony collapse disorder: a descriptive study. <i>PLoS One</i> , 2009; 3;4(8):6481.	41 43

# RO 130489 B1

1

## Revendicări

3

1. Supliment alimentar, **caracterizat prin aceea că**, acesta cuprinde 50% în greutate sirop de zahăr și 50% în greutate infuzie de plante care cuprinde 33,33% în greutate urzică, 33,33% în greutate mușețel, 8,33% în greutate coada șoricelului, 8,33% în greutate cimbru, 8,33% în greutate sunătoare, 8,33% în greutate mentă.

7

2. Supliment alimentar conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, acesta conține suplimentar oțet de mere, vin de struguri curat și tinctură de usturoi.

9

3. Supliment alimentar definit în revendicările 1 și 2 utilizat în tratamentul și profilaxia nosemozei albinelor.

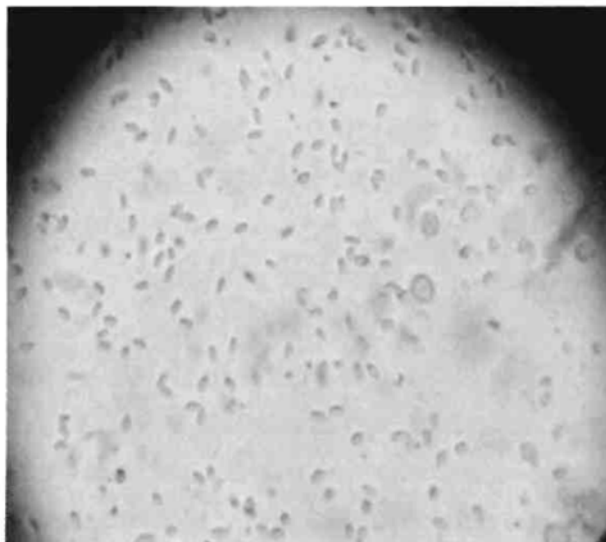


Fig. 1

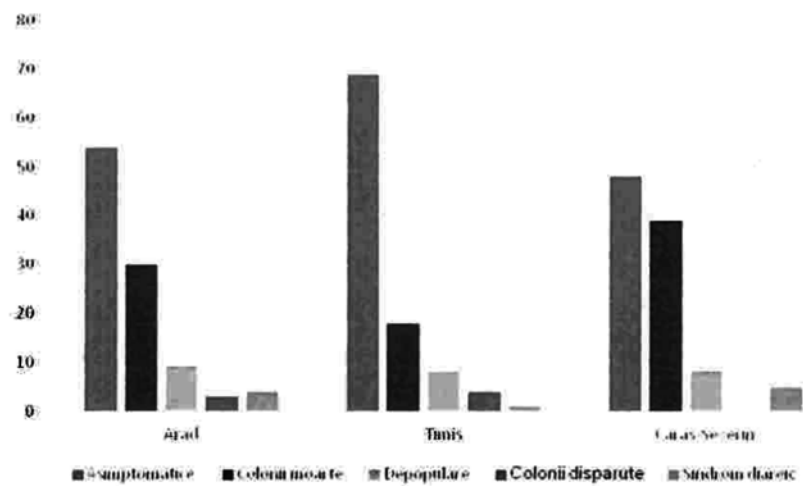
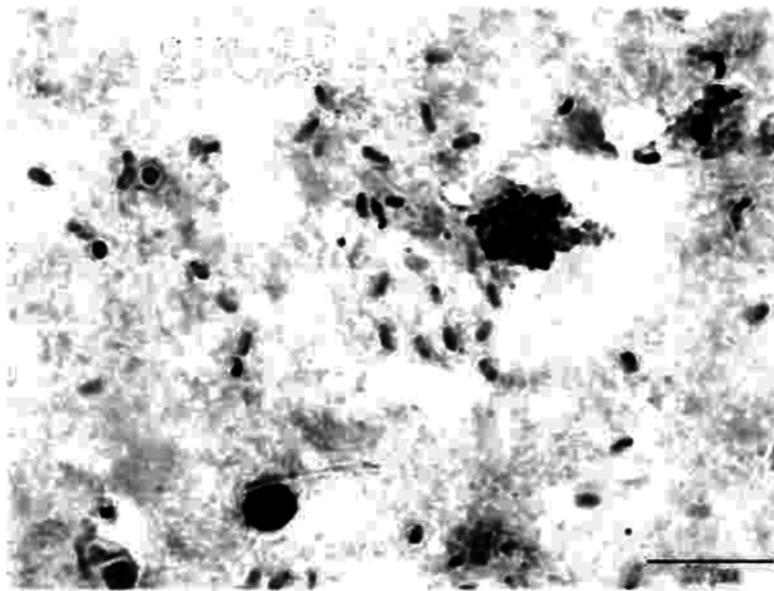


Fig. 2



**Fig. 3**

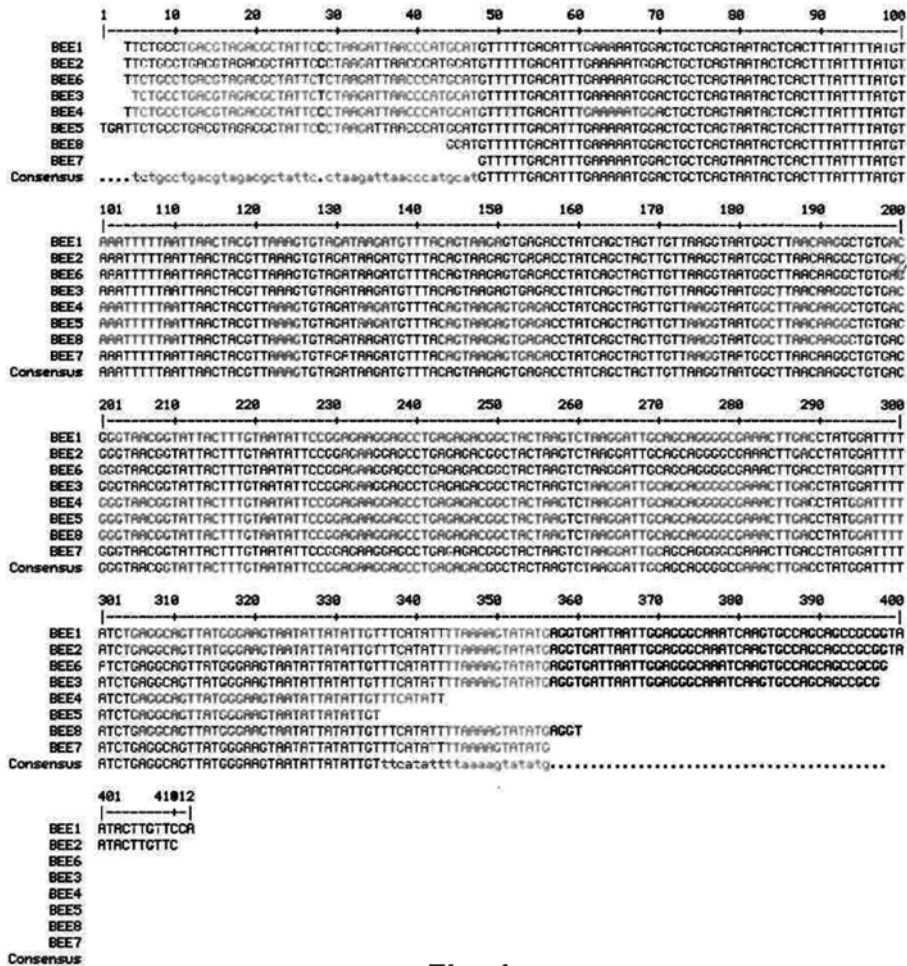


Fig. 4

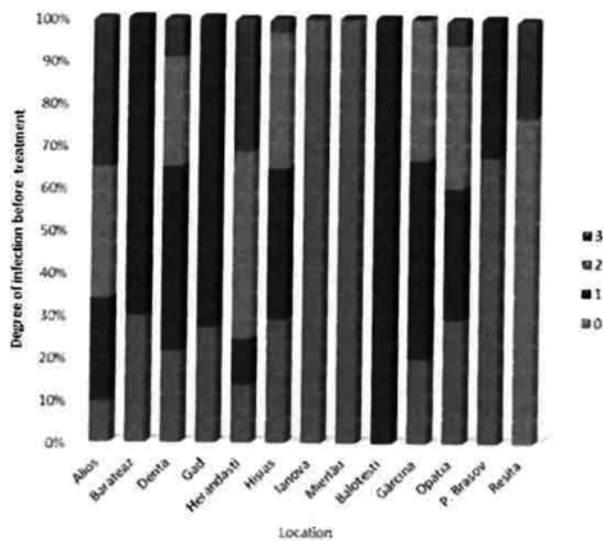


Fig. 5

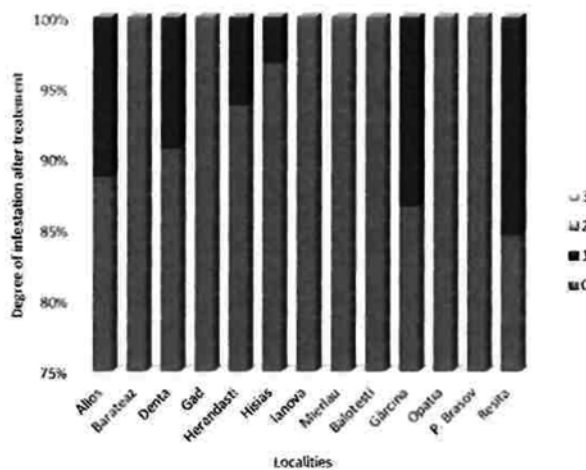


Fig. 6



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM  
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci  
sub comanda nr. 60/2021