



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2017 00741**

(22) Data de depozit: **27/11/2017**

(41) Data publicării cererii:
30/05/2019 BOPI nr. **5/2019**

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

(72) Inventatori:
• **SAVU VASILICĂ, STR. FLOARE ROȘIE
NR.7, BL.51, SC.3, ET.3, AP.95, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **ȘAPCALIU AGRIPINA,
STR. DRUMUL POTCOAVEI NR. 28B,
VOLUNTARI, IF, RO;**
• **RĂDOI ION,
STR. CONSTANTIN BRÂNCOVEANU
NR. 81, BL. 27, AP. 82, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **ANGELESCU GEORGE-DORU,
STR. MĂRĂȘEȘTI NR. 2, BUFTEA, IF, RO**

(54) **BACTEAPIS VL2 - PRODUS APIFITOTERAPEUTIC
DE UZ VETERINAR APICOL**

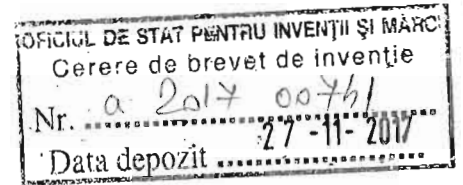
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un produs apitoterapeutic de uz veterinar destinat prevenirii bolilor bacteriene provocate de specii *Paenibacillus* și *Melisococcus* la albina *Apis mellifera Carpatica*. Produsul conform invenției este constituit în procente masice din 10...25% extract de propolis, 5...32% extract hidroalcoolic de busuioc,

7...41% extract hidroalcoolic de roiniță, 3...39% extract hidroalcoolic de oregano, 0,1...0,4% vitamina C și 0,01...0,05% vitamina B12.

Revendicări: 1
Figuri: 7





I. REVENDICARE

Invenția ce face obiectul prezentei cereri de brevet se referă la un produs apifitoterapeutic de uz veterinar, destinat *prevenției bolilor bacteriene majore la albine*, pentru care se formulează următoarele două revendicări:

1. **Denumirea produsului:** *BacteApis VL2* – produs apifitoterapeutic de uz veterinar apicol destinat prevenției bolilor bacteriene majore în familiile de albine»
2. **Compoziția produsului**, respectiv formula farmaceutică a acestuia.

Produsul apifitoterapeutic *BacteApis VL2*, conform invenției, reprezintă o formulă originală ce include principii biologice active de origine naturală, cu activități variate și complexe. Compoziția produsului este originală și valorifică produse ale stupului (propolis) alături de extracte vegetale ale unor specii de plante din flora autohtonă. Produsul are în compoziție: extract de *propolis* (10...25 %), extract hidroalcoolic de *busuioc* (5...32 %), extract hidroalcoolic de *roiniță* (7...41%), extract hidroalcoolic de *oregano* (3-39 %), *vitamina C* (0,1...0,4%) și *vitamina B₁₂* (0,01-0,05 %).

II. DOMENIUL TEHNIC DE APLICAȚIE AL PREZENTEI INVENȚII CE FACE OBIECTUL REVENDICĂRII

Prezenta invenție face referire la un produs apifitoterapeutic de uz veterinar cu aplicație în prevenția unor boli grave induse de bacteriile *Paenibacillus larvae* și *Melisococcus plutonius* la albine (*Apis mellifera carpathica*) respectiv loca americană și loca europeană. Produsul are implicații directe pentru practica veterinară și pentru domeniul apicol deoarece se adresează unei patologii grave cu efecte negative majore în evoluția familiilor de albine, asupra biodiversității în natură și asupra economiei naționale. Distrugând sursa principală de polenizare (albinele), efectul implicit antrenează pierderi importante pentru *sectorul agricol*.

Bolile bacteriene majore sunt afecțiuni infectocontagioase prezente în aproape toate țările inclusiv România, fiind boli devastatoare ce afectează stadiul larvar al albinei *Apis mellifera* și al altor specii ale genului *Apis*. În conformitate cu legislația actuală din România (ORDINUL 79/2008, ANSVSA) (www.ansvsa.ro), (Guide of Good Beekeeping practices/2011), armonizată cu legislația europeană privind sănătatea albinelor (Regulamentul 87/2011) (Directiva 92/65/2003 CE), loca americană și loca europeană sunt boli *notificabile obligatoriu*, clasificate în *lista B a OIE / 2013* (International Office of Epizootics) (www.oie.int/info/a_isum).

Loca americană este o afecțiune bacteriană prezentă în lumea întreagă, mai puțin în Africa sub-sahariană, fiind *maladia cea mai devastatoare ce afectează stadiul larvar căpăcit* al puietului de albine. Singura măsură de control a acestei boli o reprezintă distrugerea prin ardere a coloniilor infectate, ceea ce implică pagube economice considerabile pentru apicultorii. Mierea poate conține spori de *P. larvae* chiar dacă boala nu este exprimată clinic. Mai mult, simptomele pot fi suprimate dacă se utilizează tratamente preventive și curative cu antibiotice, tratamente care nu afectează sporii și ca atare aceștia pot fi regăsiți în stup. Folosirea nejudicioasă a *antibioticelor dezvoltă bacterii rezistente față de acestea* și în același timp *produsele stupului vor*

fi contaminate cu reziduuri de antibiotice, fapt nepermis de către legislația europeană și română în vigoare. O altă problemă esențială ridicată de aceste boli este existența a 4 genotipuri de tulpini ce aparțin agentului *Paenibacillus larvae*, nerecunoașterea acestor genotipuri particulare putând duce la rezultate fals-negative de diagnosticare a locii americane. Măsurile de control aplicate în loca americană depind în foarte mare măsură de *diagnosticarea corectă a acestei boli*, iar cunoașterea tuturor posibilelor variante fenotipice ale *P. larvae* este vitală pentru un diagnostic cert. Identificarea lui *P. larvae* este destul de dificilă când alte specii bacteriene de *Bacillus* și *Paenibacillus* sunt prezente și când există doar câțiva spori în probele de miere.

Loca europeană este o boală infectocontagioasă importantă a larvelor de albine, în special a celor necăpăcite, pe care le ucide la vârsta de 4-5 zile, fiind produsă de *Melissococcus plutonius*, la care se asociază și alți invadatori secundari: *Paenibacillus alvei*, *Enterococcus faecalis*, *Brevibacillus laterosporus*, *Achromobacter eurydice*. Boala este întâlnită aproape în toate arealele de pe mapamond unde este practică apicultura și cauzează importante pierderi apiculturilor. În ciuda numeroaselor cercetări efectuate, mecanismele patogenității lui *Melissococcus plutonius* rămân încă slab cunoscute sau neînțelese, iar *factorii de virulență ai acestui agent cauzal nu sunt încă cunoscuți, datorită pierderii rapide a virulenței* în condițiile cultivării germenului pe medii de cultură, boala neputând fi reprodusă *in vitro*. Deoarece pierderea rapidă a virulenței lui *M. plutonius* pe mediile de cultură constituie un impediment major pentru elucidarea patogenezei locii europene, descoperirea recentă de către cercetătorii japonezi a unor tulpini atipice de *M. plutonius*, din larvele bolnave cu semne clinice de locă europeană, poate constitui un model de studiu al patogenității acestei boli, deoarece aceste tulpini își mențin abilitatea de a determina boala chiar după ce au fost cultivate *in vitro* pe medii de cultură.

Situația pe plan național.

Loca americană și loca europeană au o *incidență ridicată în țara noastră*, în baza datele obținute din analiza probelor prelevate în teren și analizate în cadrul Laboratorului de Patologia Albinelor din Institutul de Cercetare-Dezvoltare pentru Apicultură București; incidența acestor boli în România le clasează pe poziția a doua după bolile parazitare.

Datele oficiale emise de autoritatea sanitar-veterinară către OIE *confirmă prezența acestor infecții bacteriene majore*. În acest context se impun pe lângă investigații suplimentare privind incidența și evoluția ambelor infecții pe teritoriul României și elaborarea unor măsuri noi curative și de profilaxie. (www.oie.org)

Loca americană și europeană, ca boli bacteriene majore ale albinelor, *figurează pe lista B a OIE* ([ww.oie.org](http://www.oie.org)), fiind necesară *notificarea obligatorie* a acestora, conform ordinului 79/2008 (www.ansvsa.ro), modificat ulterior (Ghidul de bune practici în apicultură, 2011).

Din anul 2008, *legislația națională armonizată cu legislația UE a impus evitarea utilizării substanțelor pe bază de antibiotice de sinteză*, pentru a *elimina apariția de reziduuri* în produsele stupului. Până în anul 2008 a fost fabricat și utilizat produsul LOCAMICIN în terapia și controlul bolilor infecțioase la albinele din România. După eliminarea acestui produs, domeniul a rămas descoperit. Există încercări pe plan național de rezolvare a acestui deficit de produse antibacteriene, dar conform datelor oficiale emise de autoritatea sanitar-veterinară (www.incpmv.ro), *nu există niciun produs antibacterian înregistrat în vederea comercializării*.

Situația pe plan internațional.

În Europa se comercializează următoarele produse pentru:

Loca europeană

- Vita BeeHealth propune produsul numit „Vita Feed Gold” care ajută la menținerea sănătății albinelor prin reducerea stresului asupra albinelor, făcându-le astfel mai rezistente la boală.
- National Bee Unit din Marea Britanie recomandă metoda „shook swarm”, care presupune scuturarea albinelor adulte de pe fagurii afectați într-un stup nou sau sterilizat, cu faguri noi pentru construit. Folosind această metodă, se reduce foarte mult recurența locii europene.
- În unele țări este permisă administrarea de oxitetraciclină ca tratament preventiv și curativ, dar există dificultăți serioase privind costurile și reziduurile de antibiotice în produsele stupului, precum și apariția bacteriilor rezistente la oxitetraciclină. <https://www.vita-europe.com/beehealth/diseases/european-foulbrood-efb/>

Loca americană

Vita BeeHealth propune produsul numit „Vita Feed Gold” care ajută la menținerea sănătății albinelor prin reducerea stresului asupra albinelor, făcându-le astfel mai rezistente la boală. Sporii sunt rezistenți la tratamentul cu antibiotice. În unele țări, cum ar fi Marea Britanie și Noua Zeelandă, coloniile infectate cu AFB trebuie distruse prin ardere. În Marea Britanie, acest lucru a redus dramatic incidența AFB. În multe alte țări, antibioticul oxitetraciclină (cunoscută și ca terramycin) este permisă ca tratament preventiv, precum și ca tratament curativ. Cu toate acestea, sporii de *P. larve* pot supraviețui antibioticului pe faguri, pe albine, în miere și pe orice echipament apicol asociat, ceea ce poate reintroduce infecția în viitor. În America de Nord și America de Sud, coloniile de albine sunt adesea tratate în mod obișnuit cu oxitetraciclină, indiferent dacă coloniile par infectate sau nu. Cu toate acestea, această abordare costă banii apicultorilor, pot lăsa reziduuri în stup și încurajează apariția bacteriilor rezistente la oxitetracicline. <https://www.vita-europe.com/beehealth/diseases/american-foulbrood-afb/>

Terramicina este utilizată de către americani în controlul locii americane, deși încă din anul 2000 (Miyagi et al. 2000) s-a arătat că loca americană a căpătat rezistență la acest antibiotic, în timp ce rezistența la acest antibiotic nu a apărut în Marea Britanie (Waite et al. 2003b). Utilizarea Terramicinei împotriva locii europene, ca metodă profilactică în coloniile de albine non-simptomatice și chiar în stupinile infectate, nu este recomandată (Thompson and Brown 2001). O metodă promițătoare pentru controlul locii europene a fost dezvoltată în Marea Britanie și presupune combinarea utilizării antibioticelor împreună cu eliminarea echipamentelor contaminate și scuturarea albinelor adulte într-un stup nou sau dezinfectat, dar, totuși, recurența bolii poate fi o problemă majoră. Această metodă pare să contribuie la controlul recurenței în anul următor, în plus față de controlul bolii în anul curent.

<http://articles.extension.org/pages/23693/european-foulbrood:-a-bacterial-disease-affecting-honey-bee-brood>

<https://ag.tennessee.edu/EPP/Extension%20Publications/Using%20Terramycin%20for%20the%20Prevention%20of%20American%20Foulbrood.pdf>

Pentru controlul in vitro al bacteriei *P. larvae* au fost utilizate o serie întregă de uleiuri esențiale, extracte din plante, bacterii și bacteriocine, ca metode naturale de control în loca americană. https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1007%2Fs13592-016-0483-1/MediaObjects/13592_2016_483_MOESM1_ESM.pdf

Pentru familiile deja infectate nu există medicamente pentru controlul locii americane și europene, oxitetraciclină și tylanul putând fi utilizate pentru prevenirea bolii. Tratamentul se aplică la începutul primăverii și trebuie oprit cu patru săptămâni înainte de primul flux important de miere. Mierea cu urme de antibiotice nu poate fi vândută pentru consumul uman. Tratamentul cu antibiotice se poate face și toamna, după ultima recoltă de miere. Antibioticele nu au puterea de a distruge sporii, împiedicând doar dezvoltarea infecției. Când medicația este oprită, apare

loca americană. În Marea Britanie, Olanda și în alte țări nu este permis tratamentul pentru loca americană. Stupii infectați sunt arși, reducând astfel riscul de contaminare și răspândirea bolii. Sterilizarea echipamentului apicol se poate face prin iradiere gamma, încălzirea într-o cutie special proiectată numai în acest scop sau prin ardere. Coloniile nu ar trebui hrănite cu miere și polen infectate cu AFB. Aparatele apicole trebuie să fie curățate și dezinfectate.

<http://ehoneybees.com/Pests-disease/american-foulbrood.php#.WeSGNjtx3IU>

Un alt antibiotic utilizat în tratarea locii americane este tylozina. Spre deosebire de Terramycinnă, tylozina se folosește numai după ce boala a fost observată la puiet, în doză de 200 mg/tratament. Simptomele bolii sunt eliminate foarte repede, dar reziduurile de Tylan persistă în stup mai mult timp decât cele de Terramycină: persistă în stup și sirop de zahăr și un an în miere.

<http://entomology.ucdavis.edu/files/147615.pdf>

Pentru tratarea infecțiilor cu locă americană au fost încercați și bacteriofagii obținuți din culturi Fawkes, Emery și Abouro, de cel puțin 108 unități/ml, prin aplicații sub formă de spray. S-au folosit 25 ml de fagi Fawkes, 25 ml fagi Emery/Abouo și 275 ml dintr-o mixtură 1:1 zahăr cu apă distilată. Fagurii au fost tratați prin spray-ere cu aprox. 8 ml de tratament pe fiecare parte a fagurelui. Fiecare stup infectat a fost tratat de 3 ori la interval de 3 zile între tratamente. Rezultatele au arătat o îmbunătățire după aplicarea tratamentului. <http://jur.byu.edu/?p=18648>

Prin teste *in vitro* s-a determinat activitatea antimicrobiană a 5 polipeptide antimicrobiene din hemolimfa albinelor (apidaecina, abaecina, hymenoptaecina, defensina-1 și defensina-2) împotriva celulelor vegetative de *P. larvae*. Rezultatele au arătat că fiecare polipeptidă antimicrobiană afectează creșterea celulelor de *P. larvae* în momente diferite (la 6, 12, 18 și 24 de ore). Defensinele 1 și 2 au avut cel mai mare efect inhibitor, uneori mai mare decât o scădere de 25%. Defensina-2 și apidaecina au prezentat cea mai mare activitate antimicrobiană. Utilizarea în combinație a defensinei 2 cu alte polipeptide antimicrobiene nu a prezentat mai multă activitate antimicrobiană decât atunci când defensina-2 a fost utilizată singură. Mai mult, atunci când defensinele au fost combinate, ele au prezentat o activitate antimicrobiană mai mică decât atunci când fiecare a fost utilizată singură. Concluzia a fost că efectul antimicrobian al defensinelor asupra *P. larvae* nu poate fi îmbunătățit prin utilizarea acestora în combinație.

<https://reeis.usda.gov/web/crisprojectpages/0224189-new-treatments-for-american-foulbrood-using-the-microbes-biology-against-it.html>

III. STADIUL TEHNICII, CONSIDERAT UTIL PENTRU ÎNȚELEGEREA OBIECTIVULUI INVENȚIEI

Apicultura reprezintă un domeniu al activității umane cu importanță majoră atât pentru economie cât și sub aspectul biodiversității. În *raportul Comisiei pentru Agricultură și dezvoltare rurală din cadrul Parlamentului European prezentat în ședința din 25 octombrie 2011*, raportorul european pentru Agricultură recomandă inițierea și susținerea activităților de cercetare și difuzare a cunoștințelor legate de sănătatea albinelor și elaborarea unor noi 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 biodiversitatea depind una de alta, iar albinele, prin activitatea lor, furnizează deopotrivă importante beneficii din punct de vedere ecologic, economic și social, asigurând securitatea alimentară și conservând biodiversitatea.

Comisia Europeană recomandă țărilor europene să întărească susținerea cercetării 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 obținerii unor medicamente veterinare pentru lupta contra agenților etiologici. Se recomandă utilizarea unor molecule și a unor formule farmaceutice pe baza de acizi organici, uleiuri esențiale și a altor substanțe autorizate în lupta biologică contra patogenilor. Raportorul european invită statele europene să asigure o susținere financiară cercetării, dezvoltării și testării unor noi medicamente ce vizează sănătatea albinelor și să încurajeze industria farmaceutică să dezvolte producția noilor medicamente destinate controlului bolilor la albine. (Rapport, Commission de l'agriculture et du développement rural, 25 octobrie 2011, rapporteur Csaba Sandor Tabajdi)

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 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 asemenea cererea de modificare a cadrului de reglementare a Agenției Europene a medicamentului, în scopul protejării drepturilor intelectuale, astfel încât acestea să fie în măsură să garanteze exclusivitatea producției și comercializării noilor substanțe active din compoziția produselor veterinare inovative. Prezentul brevet se încadrează în linia acestor recomandări, oferind un concept actual și original.

Bolile bacteriene majore (loca americană și loca europeană) sunt afecțiuni infectocontagioase prezente în aproape toate țările (inclusiv România), fiind boli devastatoare ce afectează stadiul larvar al albinei *Apis mellifera* și al altor specii ale genului *Apis*. Ele pot antrena pierderi economice substanțiale. În conformitate cu legislația actuală din România (ORDINUL 79/2008, ANSVSA) (www.ansvsa.ro), (Guide of Good Beekeeping practices/2011), armonizată cu legislația europeană privind sănătatea albinelor (Regulamentul 87/2011) (Directiva 92/65/2003 CE), loca americană și loca europeană sunt boli *notificabile obligatoriu* fiind clasificate în lista B a OIE / 2013 (International Office of Epizooties) (www.oie.int/info/a_isum).

Scopul aplicării brevetului

Proodus apifitoterapeutic cu acțiune bacteriostatică, de uz veterinar, **destinat profilaxiei bolilor bacteriene majore la albine** provocate de specii ale genului *Paenibacillus* și *Melisococcus*, la albina *Apis mellifera* Carpathica.

Componentele de bază ale produsului reprezentate de extractele hidroalcoolice de propolis, extractele hidroalcoolice de busuioc, roiniță oregano și vitamina C și vitamina B₁₂, *compoziția chimică* complexă (uleiuri volatile, triterpene, acizi policarboxilici, flavone, taninuri, rășini, vitamine, oligoelemente) îi conferă produsului acțiuni complexe curative (antibacteriene, antiseptice, imunomodulatoare, antiinflamatoare, antioxidante și regenerative).

Din studiul bibliografic efectuat, *nu a fost decelat niciun produs similar* cu cel revendicat în prezentul brevet sub aspectul compoziției chimice, lucru ce constituie originalitate.

În condițiile lipsei pe piața internă a unor produse care să fie utilizate pentru protecția albinelor, *fără efecte secundare negative asupra familiei de albine* și a sursei produselor stupului, prezentul brevet care se referă la obținerea unei formule apifitoterapeutice originale, competitive, pe bază de extracte (din plante) și din produse apicole (propolis) pune la dispoziție un mijloc de control al bolilor bacteriene majore la albine, care satisface deziderentele apiculturii clasice și ecologice, fără să lase reziduri nocive în produsele stupului.

IV. INCLUDEREA OBIECTULUI PREZENTEI INVENȚII ÎN CONTEXTUL DEZVOLTĂRII DURABILE

Combaterea bolilor bacteriene majore la albine, în contextul interzicerii antibioticelor de către UE, se bazează pe distrugerea coloniilor de albine și a inventarului apicol, după notificarea obligatorie pentru loca americană și loca europeană. Utilizarea produsului apifitoterapeutic de uz veterinar, pe baza acțiunii sale bacteriostatice în profilaxia bolilor bacteriene provocate de specii ale genului *Paenibacillus* și *Melissococcus* la albina *Apis mellifera carpathica*, reprezintă noutate pe plan național și internațional. Scopul urmărit fiind limitarea infecțiilor la albine, asigurarea dezvoltării puietului la albine, creșterea capacității de recoltare (cules) și de polenizare, respectiv creșterea producțiilor agricole fără reziduuri chimice, va asigura o dezvoltare durabilă a apiculturii, horticulturii și agriculturii în general, a economiei regionale și naționale, creșterea numărului locurilor de muncă și sănătatea populației.

În concluzie, produsul apifitoterapeutic previne infecțiile, crește gradul de sănătate și bunăstare a albinelor și revigorează agricultura cât și întreaga economie a României. Protejarea albinelor duce la asigurarea biodiversității și dezvoltarea durabilă a economiei în România.

V. COMPOZIȚIA CHIMICĂ A PRODUSULUI CE FACE OBIECTUL INVENȚIEI

Produsul fitoterapeutic *BacteApis VL2* este un produs condiționat sub formă de soluție, cu administrare orală (inclus în sirop de zahăr sau în turte).

Compoziția chimică:

Produsul apifitoterapeutic *BacteApis VL2*, conform invenției reprezintă o formulă originală ce include principii biologice active de origine naturală cu activități biologice variate și complexe. Compoziția produsului este naturală și valorifică produse ale stupului (propolis) alături de extracte vegetale ale unor specii de plante din flora autohtonă. Produsul are în compoziție: extract de *propolis* (10...25 %), extract hidroalcoolic de *busuioc* (5...32 %), extract hidroalcoolic de *roiniță* (7...41%), extract hidroalcoolic de *oregano* (3-39 %), *vitamina C* (0,1...0,4%) și *vitamina B₁₂* (0,01-0,05 %).

Toate aceste extracte utilizate în formulare aduc un conținut ridicat de principii biologice active ca proporție și acțiuni specifice (antiseptice, antiparazitare, antiinflamatoare, imunomodulatoare, antioxidante și regenerative), după cum urmează:

- *Tinctura de propolis* utilizată ca extract vegetal, are un conținut ridicat în rășini, balsamuri, uleiuri vegetale, ceară, aminoacizi liberi (prolină, arginină), terpeni, vitamine, oligoelemente (Al, Ag, Co, Fe, Mg, Mn, Cu), flavonoizi. Ea are activitate antimicrobiană, antioxidantă, antiinflamatoare și antiparazitară.
- *Extractul hidroalcoolic din busuioc (Ocimum basilicum)* are în compoziție uleiuri volatile (0,05-0,25%) de tipul eugenol, camfor, camfen, ametol, citronelol, piron, ocimen, terpineol, linalol, metil clavicol, gennanol, mircen, cu acțiuni variate: antiseptic, antibacterian, decongestiv, imunomodulator, antioxidant, cicatrizant.
- *Extractul hidroalcoolic din roiniță (Melissa officinalis)* cu conținut ridicat în uleiuri volatile (0,05-0,3%) de tipul citronelol, beta-cariofilen, linalol, limanen, ocimen, germacren D, metil-carvinon, anetol. Acțiunile specifice pe care le conferă produsului sunt în principal

antiinflamatoare, antivirale și atractant pentru albine.

- *Extractul hidroalcoolic din oregano (Origanum vulgare)* cu conținut ridicat în uleiuri eterice (carvacrolul, timolul, limonenul, pinenul, ocimenul și cariofilena) este utilizat pentru proprietățile sale terapeutice (la nivelul tubului digestiv) și dezinfectante (ajută la eliminarea microbilor din organism).
- **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). La albine intervine în metabolismul glucidelor.
- **Vitamina B12**, este vitamina care are o grupare cian și conține Cobalt, cu rol foarte important în funcția sistemului nervos, în utilizarea hemoglobinei și în structura hematiilor (antianemic). La albine intervine în metabolismul glucidelor.

Produsul apifitoterapeutic Bacteapis VL₂ este realizat după un procedeu standard de fabricație (care nu face obiectul revendicării) procedeu ce respectă normele de Bună practică pentru fabricarea și producția farmaceutică. Procedeele de fabricație, condiționare și controlul pe flux sunt redată în *tabelul nr. 1*

Tabelul nr. 1 Cronologia operațiilor și fluxul tehnologic pentru obținerea produsului apifitoterapeutic *BacteApis VL2*

Materia primă	Cronologia operațiilor	Controlul în curs	
extract de <i>propolis</i> , extract hidroalcoolic de <i>busuioc</i> , extract hidroalcoolic de <i>roiniță</i> , extract hidroalcoolic de <i>oregano</i> , <i>vitamina C</i> <i>vitamina B12</i>	<i>Achiziționare</i> de materii prime, solvent, excipienți	Verificare specificații tehnice ale materiilor prime Verificare intermediară	
	<i>Pregătire</i> materii prime și a vaselor pentru introducere la macerat (cântărire, mărunțire)	Timp de macerare Verificare intermediară	
	Solvent (alcool etilic 96°)	<i>Amestecare</i> materii prime și solvent	Tehnică specifică Verificare intermediară
			Obținerea de <i>extracte hidroalcoolice</i> din plante
Excipienți	<i>Obținerea soluției finale</i>	Analiza finală a produsului (examene: organoleptic, fizico-chimic și microbiologic) Verificare finală	
		<i>Ambalare primară</i> (Flacon 300 ml, etichetare)	Eliberare B.A. produs finit (identificare lot)
	<i>Depozitare</i>	Verificare condiții de păstrare	

Alte produse cu acțiuni similare.

- I. **Produse Non-Antibiotice:** din studiul bibliografic efectuat, *nu au fost identificate produse similare* cu cele incluse sub aspectul compoziției chimice al produsului apifitoterapeutic obținut, lucru ce constituie originalitate.
- II. **Produse antibiotice:** În România se comercializează următoarele produse, dar care nu au autorizație validă pentru administrarea acestora la albine:
Loca europeană: Oxitetraciclină, Tilozina sau Lincomicina
Loca americană: Terramycin, Tylan

Avantajele produsului apifitoterapeutic *BacteApis VL2*

Relevanța practică a obținerii produsului apifitoterapeutic constă în:

1. *introducerea pe piața internă a unui produs nou apifitoterapeutic* destinat terapiei și profilaxiei bolilor majore bacteriene la albine;
2. *activități specifice complexe capabile să controleze boala și să inhibe lanțul biologic al agentului infecțios;*
3. *elaborarea unei noi metodologii de obținere* a unor produse apifitoterapeutice;
4. *inducerea produsului în mod curent în stupine va asigura optimizarea* profilaxiei și controlul bolilor bacteriene majore la albine;
5. *produsul asigură limitarea poluării stupului prin înlocuirea substanțelor chimice și a antibioticelor;*
6. *produsul asigură creșterea bunăstării familiilor de albine* prin controlul morbidității și mortalității în stupini;
7. *produsul asigură interferența în lanțurile ecologice* (reglează starea de sănătate, indicele de polenizare)

Blocajele identificate pe plan național în profilaxia și controlul bolilor bacteriene constă în:

- *lipsa unor produse care să înlocuiască antibioticele* folosite în tratamentul bolilor bacteriene majore;
- *diagnosticarea tardivă*, după apariția semnelor clinice de boală, fază ce nu mai poate stopa evoluția fulminantă a bolii și care impune măsuri severe care constau în distrugerea familiilor de albine afectate;
- *pierderi imense* atât pentru sectorul apicol cât și pentru agricultură în general, prin efect implicat (lipsa polenizatorilor);
- în condițiile existente, *lipsa de comunicare* între apicultori și medici veterinari cu imposibilitatea aplicării măsurilor de combatere actuale duce la extinderea cazurilor de boală ;
- *nerespectarea cerințelor* privind calitatea mierii exportate reprezintă un blocaj care se reflectă direct la nivel economic.
- *toate aceste blocaje se vor rezolva printr-o profilaxie corectă cu utilizarea produselor „BIO” în controlul bolilor bacteriene.*

VI. FORMULAREA PRODUSULUI. PRINCIPIILE DE SELECȚIE A COMPONENTELOR, ȚINÂND CONT DE VERIGILE DE ACȚIUNE ALE AGENTULUI PATOGEN

Rezultatele testelor farmacologice *in vitro* a variantelor de lucru ce au stat la baza formulării produsului

Testarea preclinică farmacologică „*in vitro*” a extractelor vegetale incluse în formula farmaceutică a produsului a inclus evaluarea activității antibacteriene a 6 extracte hidroalcoolice vegetale (busuioc, rozmarin, cimbrisor, pelin, oregano, roiniță) și a tincturii de propolis.

1. Caracterizarea fizico-chimică calitativă pentru extractele vegetale selecționate și incluse în formula farmaceutică

S-a ales determinarea compușilor polifenolici din extracte dat fiind datele din literatură privind efectul antibacterian al acestor compuși aflate în compoziția unor extracte din plante și tinctura de propolis, asupra agentului etiologic de *Paenibacillus larvae*.

Conținutul total de fenoli a fost determinat conform metodei Folin-Ciocalteu (Waterhouse, A.L. Unit 11.1. Polyphenolics. Determination of Total Phenolics. In *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*; John Wiley & Sons, Inc.: New York, USA, 2002; p. 11.1.1-11.1.8.) folosind acid galic ca standard.

Principiul metodei

Intensitatea culorii albastre formate de compușii fenolici cu reactivul Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, Germania), direct proporțională cu concentrația, a fost evaluată spectrofotometric la 765 nm. Evaluarea conținutului de fenoli s-a făcut cu ajutorul unei curbe de etalonare, folosind ca standard acid galic (Sigma-Aldrich, Germania).

Modul de lucru

Fiecare extract s-a diluat 1:4 cu apă distilată.

Schema de lucru:

20 μ L extract diluat

1,7 mL apă distilată

0,1 mL reactiv Folin-Ciocalteu

Amestecul se incubează 5 minute la temperatura camerei

0,3 mL carbonat de sodiu 20%

După o oră se citesc absorbantele la 765 nm față de martor (aceiași amestec de reacție, dar în loc de extract diluat se folosesc 20 μ L apă distilată).

Pentru fiecare extract s-au făcut câte 3 determinări, în calculul final s-a folosit media acestora.

Curba de etalonare (acid galic)

Pentru trasarea curbei de etalonare a acidului galic (GA s-au preparat soluții etalon în intervalul de concentrație 0,050-0,800 mg/mL și s-a procedat la măsurarea absorbantei la lungimea de undă de 765 nm pentru fiecare soluție standard (*fig. 1*).

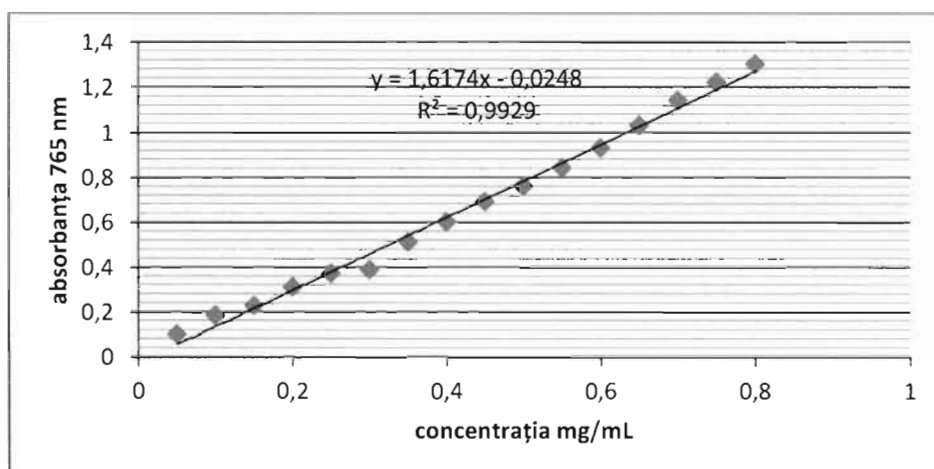


Fig. 1. Curba de etalonare a acidului galic

Rezultatele privind concentrația în fenoli a extractelor vegetale și a variantelor de lucru (formule de amestecuri de extracte) sunt prezentate în *tabelul 2*.

Tabelul 2 Concentrația totală de fenoli ($\mu\text{g EAG/ml}$) a extractelor vegetale și a variantelor de lucru

Nr.crt.	Extract/variantă de lucru	Concentrația totală de fenoli ($\mu\text{g EAG/ml}$)
1.	Extractul de roinița	2930,20
2.	Extractul de cimbrisor	1337,70
3.	Extractul de rozmarin	866,32
4.	Extractul de pelin	942,76
5.	Extractul de oregano	2089,36
6.	Tinctura de Propolis	14.651,00
7.	Varianta de lucru 1	5041,90
8.	Varianta de lucru 2	5096,00
9.	Varianta de lucru 3	1592,50

*EAG - Echivalent Acid Galic

Rezultatele obținute pe extractele hidroalcoolice vegetale au evidențiat prezența compușilor polifenolici în concentrații foarte variate (866,32 -2930,20 $\mu\text{g EAG/ml}$), în timp ce tinctura de propolis a prezentat concentrația cea mai mare de polifenoli (14.651 $\mu\text{g EAG/ml}$).

În ceea ce privește variantele de lucru (obținute deja în etapa II), varianta II selecționată pentru testarea clinică a prezentat concentrația de polifenoli cea mai mare (5.096,00 $\mu\text{g EAG/ml}$).

Testarea „*in vitro*” a acțiunii antibacteriene a extractelor vegetale s-a efectuat prin metoda difuziei pe agar cu discuri standard impregnate (\emptyset 10 mm), o metodă uzuală de testare a sensibilității antimicrobiene prevăzută în Farmacopeea Română Ed. X, măsurându-se diametrul zonei de inhibiție.

Testarea a fost efectuată pe o tulpină de *Paenibacillus larvae* obținută în urma izolării din stupinile monitorizate (sezon activ apicol 2016), comparativ cu tulpina de referință *Paenibacillus larvae* ATCC 9545.

Înainte de testare, extractele au fost verificate microbiologic în vederea excluderii contaminării bacteriene, conform protocoalelor standard.

Tulpina de *Paenibacillus larvae* obținută în urma izolării din stupine monitorizate și tulpina de referință de *Paenibacillus larvae* s-au însămânțat inițial în bulion MYPGP, la 37°C, timp de 24 h, fiind ulterior pasate pe agar MYPGP și incubate la 36-37°C, timp de 48h. Aspectul bacterioscopic al culturii de *Paenibacillus larvae* (col. Gram) este prezentat în figura 2.

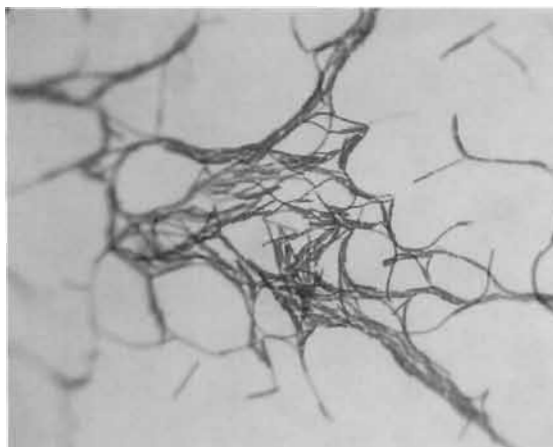


Fig. 2. Frotiu din cultura de 48 h de *Paenibacillus larvae*, col. Gram, ob. x1000

Ca martor pozitiv pentru testarea activității inhibitorii a tulpinilor de *Paenibacillus larvae* s-au utilizat microcomprimate standard de tetracilină (concentrație de 1μg).

Plăcile au fost lăsate circa 5-10 minute la temperatura camerei, pentru o mai bună aderare a microcomprimatelor la suprafața agarului și apoi au fost incubate la 36-37°C, timp de 48h.

Testarea fiecărui extract vegetal s-a efectuat în două serii de probe.

După 48h de la incubare, fiecare placă a fost examinată, urmărindu-se pe de o parte, creșterea uniformă a culturii de *Paenibacillus larvae*, iar pe de altă parte, zonele de inhibiție completă (uniform-circulare) din jurul microcomprimatului. Diametrul zonei de inhibiție completă a fost măsurat cu o riglă, luând în calcul și diametrul microcomprimatului (10 mm).

Zona de inhibiție înregistrată în cazul tetracilinei (martor pozitiv) a fost de 45 mm, în timp ce martorul negativ (apă distilată) nu a prezentat zonă de inhibiție (Fig. 3).

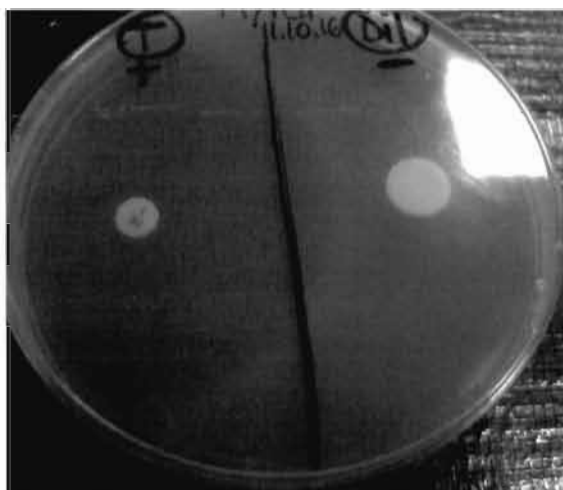


Fig. 3. Zona de inhibiție a matorului pozitiv (Tetraciclina) (stg.) și lipsa zonei de inhibiție pentru matorul negativ (apă distilată) (dr.)

Rezultatele obținute în urma testării extractelor ca atare și a celor diluate (diluția 10^{-1}), la concentrația de 80 μ l/comprimat, sunt prezentate în *tabelul 3*.

Diametrul mediu al zonei de inhibiție completă (mm) a extractelor vegetale cu tulpina de *Paenibacillus larvae* obținută în urma izolării din stupinile monitorizate (după 48 h)

Tabelul 3

Tipul extractului / Martori	Diametrul mediu în mm al zonei de inhibiție completă (după 48h) pentru tulpina <i>selecționată de Paenibacillus larvae</i>		Diametrul mediu în mm al zonei de inhibiție completă (după 48h) pentru tulpina de <i>referință de Paenibacillus larvae</i>	
	Extractul ca atare	Extract la diluția 10^{-1}	Extractul ca atare	Extract la diluția 10^{-1}
Extractul 1 (Busuic) [80 μ l]	11	0	19	0
Extractul 2 (Rozmarin) [80 μ l]	13	11	11	9
Extractul 3 (Cimbrisor) [80 μ l]	13	0	12	0
Extractul 4 (Pelin) [80 μ l]	11	0	12	0
Extractul 5 (Oregano) [80 μ l]	16	12	16	11
Extractul 6 (Roiniță) [80 μ l]	0	0	0	0
Extractul 7 (Tinctura Propolis) [80 μ l]	23	20	26	21
Extractul 1+7 [80 μ l]	21	-	22	-
Extractul 2+7 [80 μ l]	23	-	21	-
Extractul 3+7 [80 μ l]	22	-	22	-
Extractul 4+7 [80 μ l]	23	-	21	-
Extractul 5+7 [80 μ l]	25	-	26	-
Extractul 6+7 [80 μ l]	23	-	23	-
Martor pozitiv	45		45	

(tetraciclina) [1mcg]		
Martor negativ (mediul de diluție)	0	0

Cel mai puternic efect inhibitor față de tulpina de *Paenibacillus larvae* selecționată și față de cea de referință a fost observat la tinctura de propolis (23 mm, respectiv 26 mm). (Fig. 4)

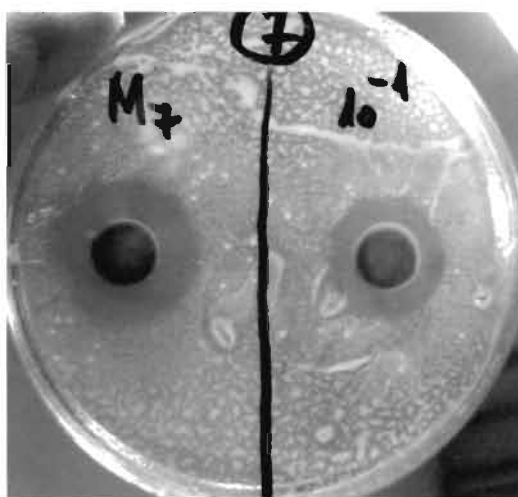


Fig. 4. Efectul inhibitor al extractului 7 (tinctura de propolis)

Efectele inhibitorii ale celorlalte extracte, în ordine descrescătoare, au fost de: 16 mm extractul de oregano, 13 mm la extractele de rozmarin și cimbrisor și 11 mm la extractele de busuioc și pelin. Extractul de roiniță nu a exprimat nicio acțiune inhibitorie.

Prin combinarea tincturii de propolis cu fiecare din cele 6 extracte (busuioc, rozmarin, cimbrisor, pelin, oregano, roiniță) s-a observat un efect de potențare a activității antimicrobiene față de ambele tipuri de tulpini de *Paenibacillus larvae* (selecționată, respectiv de referință) doar în cazul combinării tincturii de propolis cu extractul de oregano (25 mm, respectiv 26 mm). Combinația tincturii de propolis cu extractul de oregano se regăsește în varianta finală a formulei produsului apifitoterapeutic (VL 2).

VII. FORMULAREA PRODUSULUI FINAL APIFITOTERAPEUTIC FECTUAT ÎN BAZA REZULATELOR OBTINUTE ÎN FAZE ÎNȚIALE DE TESTARE

Fazele inițiale de testare a produsului apifitoterapeutic au permis stabilirea efectelor profilactice în teren, pe familii de albine infectate natural, concomitant cu stabilirea eficienței *in vitro* pe culturi de *Paenibacillus larvae* din tulpina de referință *Paenibacillus larvae* ATCC 9545 și dintr-o tulpină izolată din teren (confirmată de IDSA). Pe baza determinărilor concentrației de polifenoli a variantelor de lucru 1, 2, 3 și comparativ a tincturii de propolis s-a formulat compoziția finală a produsului apifitoterapeutic.

Aceasta a fost testată *in vitro* după verificarea microbiologică în vederea excluderii contaminării bacteriene și fungice, conform protocoalelor standard în paralel cu un martor pozitiv (comprimate standard de tetraciclină). Testarea produsului apifitoterapeutic s-a efectuat prin inhibarea dezvoltării culturilor din tulpina de *Paenibacillus larvae* izolată și din tulpina standard după 48 h de incubare, prin măsurarea zonei de inhibiție comparativ cu cea determinată la martorul pozitiv (tetraciclină) și cu martorul negativ (apa distilată).

Pe baza rezultatelor testărilor *in vitro* s-a trecut la testarea *in vivo* pe familiile de albine monitorizate, din stupinile diagnosticate pozitiv.

VIII. STABILIREA DOZEI DE ADMINISTRARE A VARIANTEI DE PRODUS FINAL

BACTEAPIS VL2 ce face obiectul prezentei invenții, pe baza modelului „*in vivo*”, utilizând familii de albine și administrarea ei sub formă de miere/apa (1:1) sau sirop de zahăr/apă (1:1) și pastă.

Deoarece nu s-a pus problema până în prezent pentru diagnosticarea precoce a bolilor bacteriene majore la albine, prin analiză bacterioscopică din probele de intestine de albine clinic sănătoase, probe de miere, polen și faguri, provenite de la stupini fără evoluție clinic a bolilor bacteriene la puiet, această tehnică de diagnostic s-a dovedit eficientă în prevenirea unor episoade de evoluție clinic a bolilor bacteriene majore la albine, prin eliminarea din circuit a surselor alimentare contaminate care constituie principalul mijloc de infecție și răspândire a acestor entități morbide care provoacă pagube mari în apicultură, dar și în agricultură prin scoaterea din circuitul economic al polenizatorilor, principalii factori de sporire a recolter agricole).

Metoda de diagnostic precoce al bolilor bacteriene majore la albine (bazată pe examenul bacterioscopic al intestinului clinic al intestinului albinelor clinic sănătoase și al produselor stupului), fiind o metodă originală, simplă, poate scurta foarte mult luarea unor decizii în ceea ce privește măsurile care se impun pentru limitarea pierderilor și împiedicarea transmiterii infecției. Astă metodă de diagnostic precoce a bolilor bacteriene majore la albine a fost verificată de-a lungul timpului în cadrul Laboratorului de Patologia albinelor (ICDA) pe un număr foarte mare de stupine private, iar validitatea ei a fost de fiecare dată confirmată prin examene suplimentare de diagnostic de certitudine, bacteriologice și moleculare (RT-PCR).

Pornind de la această metodă de diagnostic precoce a bolilor bacteriene majore la albine, continuând cu necesitatea aplicării unor măsuri ferme de prevenire și stopare a infecțiilor

familiilor de albine, în contextual interzicerii antibioticelor ca tratament preventiv și curativ al locii americane și locii europene, obiectivul invenției a fost de a obține un produs apifitoterapeutic de uz veterinar destinat profilaxiei bolilor majore la albine, care să satisfacă cele 2 ramuri ale apiculturii (apicultura clasică și apicultura ecologică), care să nu lase reziduuri în produsele stupului și care să fie destul de eficient încât să prevină apariția acestor boli devastatoare la albine. Administrarea acestui produs apifitoterapeutic *BacteApis VL2*, după diagnosticul prezumtiv precoce al existenței germenilor patogeni ai locii americane și locii europene din intestinalele albinelor și din sursele de hrană ale acestora, a dus la prevenirea izbucnirii acestor boli grave în sezonul apicol următor cu rezultate foarte bune în sporirea producției apicole și a calității produselor obținute.

Au fost derulate 2 experimente pentru testare clinică, unul vizând efectul produsului *BacteApis VL2* pe albine clinic sănătoase, dar purtătoare de germeni și celălalt pe albine fără semne clinice, dar supuse presiunii infecțioase de la stupinile pozitive în care au evoluat bolile bacteriene majore (confirmate de IDSA).

- *Experimentul 1:* 109 familii de albine clinic sănătoase purtătoare de germeni ai bolilor bacteriene majore, fără semne clinice de boală (lot experimental monitorizat în scopul administrării profilactice *BacteApis VL2*), urmărite în paralel cu un lot martor netratat (23 familii de albine);
- *Experimentul 2:* 324 familii de albine purtătoare de germeni ai bolilor bacteriene majore, cu depopulări, mortalitate crescută, dar fără semne clinice de boală la puiet (lot experimental monitorizat), comparativ cu 30 familii de albine ca lot martor netratat.

Doza de administrare, conform celor două procedee experimentale prezentate mai sus, a fost stabilită în scop profilactic ca fiind de:

- 10 ml/l de sirop administrat la interval de 2 zile, 3-5 administrări, toamna înainte de intrarea în iernare, în funcție de gradul de prezență a agenților etiologici, tipul agentului etiologic care a determinat loca (americană sau europeană) și gradul de depopulare al familiilor de albine din stupină;
- 15 ml/kg turtă cu administrare în sezonul inactiv (sfârșitul lunii decembrie, și în lunile ianuarie, februarie)

IX. TESTAREA CLINICĂ A PRODUSULUI APIFITOTERAPEUTIC *BACTEAPIS VL2*

Testarea clinică a produsului apifitoterapeutic *BacteApis VL2* 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.

Lotul de cercetare a inclus 6 stupini ce au prezentat doar suspiciune de boli bacteriene majore, în timp ce 97 stupini care prezentau și alte afecțiuni (varrooză, nosemoză, suspiciuni de intoxicații, etc) au fost excluse. Cele 6 stupini private incluse în testare a reunit un număr de 486 familii de albine, dintre care 433 familii de albine au constituit lotul experimental, iar lotul martor a fost format din 53 familii de albine.

Au fost derulate 2 experimente pentru testare clinică, unul vizând efectul produsului *BacteApis VL2* pe albine clinic sănătoase, dar purtătoare de germeni și celălalt pe albine fără semne clinice, dar supuse presiunii infecțioase de la stupinile pozitive în care au evoluat bolile bacteriene majore (confirmate de IDSA).

- *Experimentul 1:* 109 familii de albine clinic sănătoase purtătoare de germeni ai bolilor bacteriene majore, fără semne clinice de boală (lot experimental monitorizat în scopul administrării profilactice BacteApis VL2), urmărite în paralel cu un lot martor netratat (23 familii de albine).
- *Experimentul 2:* 324 familii de albine purtătoare de germeni ai bolilor bacteriene majore, cu depopulări, mortalitate crescută, dar fără semne clinice de boală la puiet (lot experimental monitorizat), comparativ cu 30 familii de albine ca lot martor netratat.

Diagnosticul de pozitivitate al familiilor de albine purtătoare de germeni ai bolilor bacteriene majore pentru toate stupinile din experimentul 1 și 2 s-a efectuat prin examen bacterioscopic direct al conținutului intestinal și prin examen bacterioscopic pe frotiu (col. Gram).

Examenul clinic al stării de sănătate s-a bazat pe simptomatologia albinelor adulte cât și pe aspectul puietului. El a fost corelat cu indicele de morbiditate și mortalitate, productivitatea stupinei, puterea familiei de albine. Investigațiile efectuate pe tot parcursul anului apicol 2017 (octombrie 2016–septembrie 2017), au evidențiat următoarele aspecte pe fiecare sublot monitorizat:

Experimentul 1: în cadrul lotului experimental 1, examenul clinic a evidențiat existența familiilor de albine clinic sănătoase, dar purtătoare de germeni ai bolilor bacteriene majore. Au fost recoltate probe în vederea examenului de laborator, fiind investigat conținutul intestinal prin microscopie directă, examen bacterioscopic și bacteriologic. Au fost recoltate și examinate suplimentar probe de miere de la aceleași stupini (monitorizate și diagnosticate pozitiv în urma examinării probelor de conținut intestinal provenite de la albinele vii).

Experimentul 2: în cadrul lotului experimental 2 examenul clinic a evidențiat existența unor depopulări și a unor cazuri de mortalitate la albine, scăderea productivității stupinei și a puterii familiei de albine, în condițiile absenței unor semne clinice pentru bolile bacteriene majore la puiet. Au fost recoltate probe de albine vii și moarte și evaluate după același protocol ca în experimentul 1.

Rezultatele analizelor de laborator efectuate pe probele prelevate (din intestinul albinelor luate în studiu și din probele de miere) au confirmat existența agenților etiologici pentru bolile bacteriene majore în toate probele recoltate la momentul T_0 (loturile experimentale și martor) (Fig. 5).

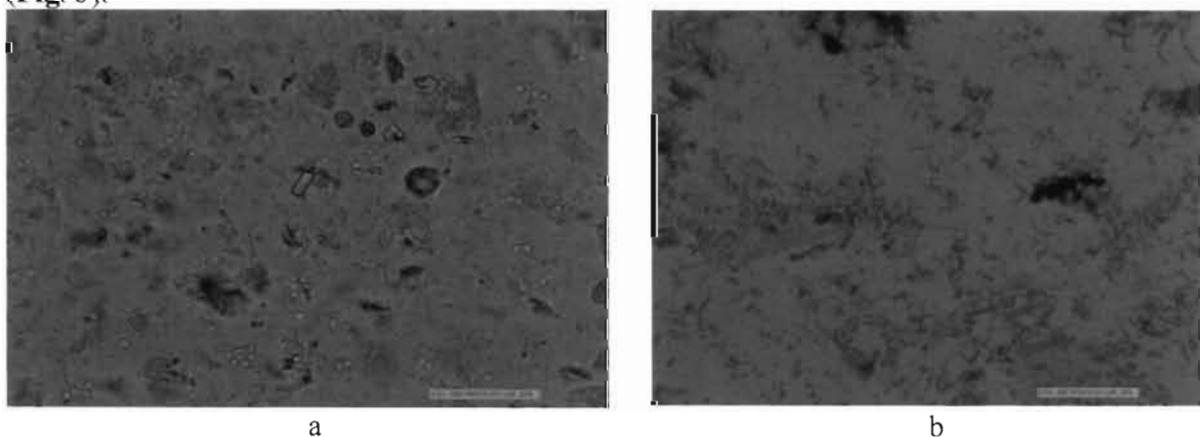


Fig. 5. Examen bacterioscopic direct (a) și examen bacterioscopic pe frotiu col. Gram (b) al conținutului intestinal cu evidențierea agenților etiologici ai bolilor bacteriene majore la albine din stupina experimentală la momentul T_0 /2016 (ob. X 40) (ob. x 100) (confirmată prin qRT-

PCR) (2017)

În urma confirmării prezenței agenților etiologici ai bolii în probele de albine (respectiv de miere) s-a instituit tratamentul cu produsul apifitoterapeutic selecționat (*BacteApis VL2*) în ambele loturi experimentale.

I. În cadrul **experimentului 1** au fost efectuate tratamente profilactice cu produsul apifitoterapeutic *BacteApis VL2*. Indicele terapeutic a fost corelat pe baza negativării conținutului intestinal al albinelor adulte pentru germenii bolilor bacteriene majore, pe perioada de iernat. Tratamentul a fost efectuat cu sirop de zahăr (10 ml produs / 1 sirop de zahăr), 3 administrări la 2 zile interval. S-a evitat folosirea de miere depistată pozitiv la examenul de laborator, pentru a înlătura și acest vector de transmitere al agenților etiologici. Rezultatul final a confirmat efectul profilactic al produsului.

Rezultatele examenului de laborator au fost pozitive la momentul T_0 (+++) și slab pozitive la finalul experimentului T_{final} (+) pentru familiile de albine din stupina 2 inclusă în experiment, și negative pentru stupinele 1 și 3 (Tab 3). Nu s-au depistat cazuri clinice de boală și nici mortalități datorate bolilor bacteriene majore, nefiind afectat puietul de albină.

În lotul martor din cadrul experimentului 1, probele de conținut intestinal au rămas pozitive la examenele de laborator pentru agenții etiologici responsabili de dezvoltarea bolilor bacteriene majore pe toată perioada de sezon inactiv (octombrie 2016 – martie 2017), chiar dacă nu au fost înregistrate depopulări (boală activă).

- La *stupina 1* și *3* la debutul experimentului (T_0) s-a constatat un grad mare de infestare al prezenței agenților etiologici bolilor bacteriene majore (luna septembrie 2016), iar la momentul T_{final} (luna martie 2017), după administrarea produsului apifitoterapeutic, s-a constatat negativarea conținutului intestinal față de agenții etiologici ai bolilor bacteriene majore la albine, în timp ce la *stupina numărul 2* diagnosticul a rămas slab pozitiv pentru conținutul intestinal (Tab. 4).

Tabelul 4

Gradul de infestare al stupinilor din experimentul 1 în perioada septembrie 2016 – martie 2017

Nr stupină	Gradul de infestare cu agenții etiologici prezenți în conținutul intestinal al albinelor vii înainte (T_0) și după administrarea produsului apifitoterapeutic (T_{final})				
	T_0	T_1	T_2	T_3	T_{final}
1.	+++	+++	++	++	-
2.	+++	+++	+++	++	+
3.	++	++	++	+	-

Analiza rezultatelor obținute în urma tratamentelor efectuate în cele trei stupini (experimentul 1), după 3 administrări la 2 zile interval, a menținut statutul de familie clinic sănătoasă, fără afectarea puietului și fără existența unor depopulări. Examenul de laborator efectuate pe probe de intestin de albine vii la momentele T_0 , T_1 , T_2 , T_3 , T_{final} au validat eficiența produsului în profilaxia bolilor bacteriene majore, cu scăderea riscului apariției acestora, dar și manifestării ulterioare a lor la albine.

- La *stupina numărul 1*, care la momentul T_0 prezenta un grad de infestare mare (+++), care s-a menținut și la momentul T_1 (după 2 zile), ulterior s-a constatat scăderea gradului de infecție la momentul T_2 , după 2 zile și T_3 după 2 zile la (++) , pentru ca la momentul T_{final} în februarie-martie, conținutul s-a negativat după cele 3 administrări la 2 zile interval de administrare.

28

- La stupina numărul 2, care prezenta un grad mare de infecție la momentul T_0 , după administrarea produsului conform protocolului experimental s-a constatat și la momentul T_{final} prezența agenților etiologici, dar în număr semnificativ redus (+).
- La stupina numărul 3, care prezenta la momentul T_0 un grad mare de infecție, după 3 administrări a produsului apifitoterapeutic conform protocolului experimental, s-a constatat negativarea conținutului intestinal la momentul T_{final} (-) (**Fig. 6**).

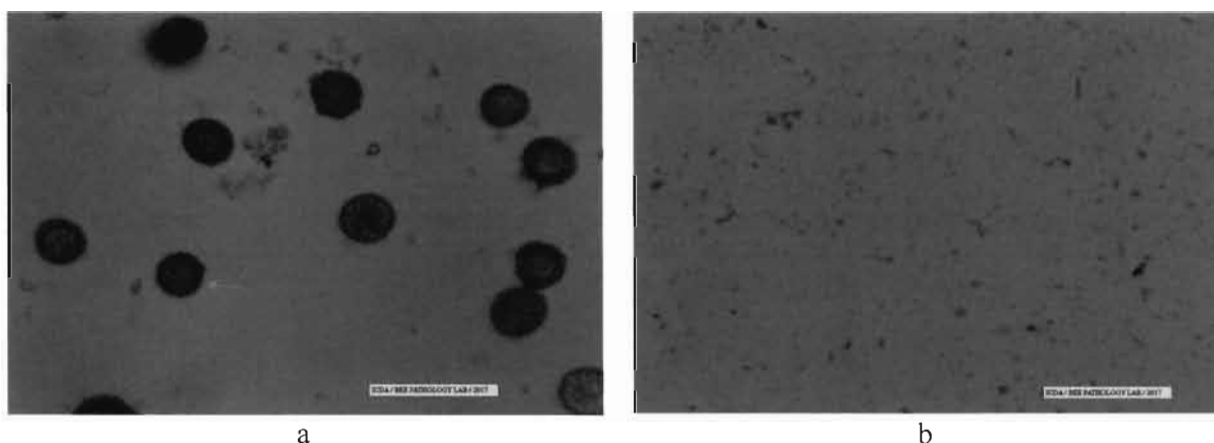


Fig. 6. Examen bacterioscopic direct (a) și examen bacteriologic pe frotiu prin col. Gram (b) al conținutului intestinal la albine provenite din stupina experimentală la momentul T_{final} 2017 (ob. X 40) (ob. x 100) (negativă prin qRT-PCR)

Administrarea siropului tratat cu produsul apifitoterapeutic în cantitate de 10 ml/ l sirop nu a prezentat efecte adverse (refuz al hranei, manifestări nervoase, tulburări de comportament, afectarea mătci și a pondei, stări toxice, sau afectarea puietului).

II. În cadrul *experimentului 2* au fost efectuate 3 tratamente la interval de 2 zile cu produsul apifitoterapeutic BacteApis VL2 numai la familiile de albine ce au constituit lotul experimental. Lotul martor (netratat) alcătuit din 30 familii de albine din toate cele 3 stupini a fost urmărit în perioada sept 2016 – martie 2017, prin monitorizarea sănătății și recoltarea de probe de albine (au rămas pozitive +++ la momentul T_{final}).

De asemenea, familiile de albine care au constituit lotul martor au fost examinate și în perioada martie-aprilie 2017, stabilindu-se gradul de depopulare și mortalitatea albinelor adulte.

În cadrul *experimentului 2* s-a constatat existența depopulărilor fără afectarea puietului la 124 de familii de albine, iar mortalitatea a fost depistată la 37 familii de albine. Protocolul terapeutic a fost aplicat în luna septembrie 2016 la sfârșitul sezonului activ, iar rezultatele au fost evaluate la sfârșitul sezonului inactiv (februarie-martie 2017). Deoarece examenele de laborator au permis depistarea prezenței agenților etiologici și în miere, protocolul terapeutic a prevăzut utilizarea siropului de zahăr pentru tratamentele efectuate, în locul mierii contaminate (sept. 2016) (**Tab. 5**).

Tabelul 5 Gradul de infestare al stupinilor din experimentul 2 în perioada septembrie 2016 – martie 2017

Nr stupină	Gradul de infestare cu agenții etiologici prezenți în conținutul intestinal al albinelor vii înainte (T ₀) și după administrarea produsului apifitoterapeutic (T _{final})						
	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T _{final}
1.	+++	+++	++	++	+	+	-
2.	+++	+++	+++	+++	+	+	+
3.	+++	+++	+++	+++	++	+	+

- La *stupina 1* la debutul experimentului (T₀) s-a constatat un grad mare de infecție cu agenți etiologici ai bolilor bacteriene majore (luna septembrie 2016). Examenul clinic a evidențiat depopulări masive (24 familii de albine) și mortalitate (16 familii de albine). Probele de miere au fost de asemenea pozitive pentru agenții etiologici ai bolilor bacteriene majore. Protocolul terapeutic s-a derulat în perioada sept-oct 2016. El a inclus 3 administrări la interval de 2 zile de sirop de zahăr în concentrație de 10 ml BacteApis VL 2/l sirop. La momentul T_{final} (luna martie 2017), după administrarea produsului apifitoterapeutic, s-a constatat negativarea conținutului intestinal față de agenții etiologici ai bolilor bacteriene majore la albine, în timp ce familiile de albine din lotul martor au rămas pozitive (+++) la momentul T_{final} (feb 2017).
- La *stupina numărul 2*, care prezenta un grad mare de infestare la momentul T₀ (+++), după administrarea produsului, conform protocolului experimental (3 administrări la interval de 2 zile) s-a constatat la momentul T_{final} prezența agenților etiologici în conținutul intestinal, dar în grad foarte redus (+). Martorul a rămas intens pozitiv (+++).
- La *stupina numărul 3*, care prezenta la momentul T₀ un grad mare de infestare (+++), după administrarea produsului apifitoterapeutic conform protocolului experimental (3 administrări la interval de 2 zile), s-a constatat la examinarea conținutului intestinal la momentul T_{final} un grad scăzut de prezență a agenților etiologici ai bolilor bacteriene majore (+). Martorul a rămas intens pozitiv (+++).

În concluzie, rezultatele obținute în urma studiilor clinice evidențiază faptul că produsul apifitoterapeutic *BacteApisVL₂* împiedică dezvoltarea infecției (aparitia bolilor bacteriene majore în formă clinică) și afectarea puietului de albine, fără efecte negative asupra producției apicole, a puterii stupului și ale ponteii mătcii. Produsul apifitoterapeutic nu a avut efecte adverse precum fenomene de intoxicație, tulburări nervoase sau de comportament la albinele adulte.

Produsul a fost bine tolerat de albine și consumat în totalitate, fără a se semnala cazuri de refuz al hranei. În final s-a recurs și la administrări suplimentare în funcție de starea de sănătate a familiilor de albine la sfârșitul perioadei de iernat.

Evaluarea sănătății albinelor la sfârșitul perioadei de iernat atât pentru loturile experimentale cât și martor, a dus la tratamentul suplimentar cu turte conținând 15 ml/1 kg turtă produs apifitoterapeutic la familiile de albine din experimentele 1 și 2 care au fost diagnosticate pozitiv în urma examenului conținutului intestinal, până la negativarea conținutului intestinal al albinelor vii (noile generații de albine).

Au fost tratate cu turte medicamentate și familiile de albine din loturile martor aparținând ambelor experimente în lunile martie, aprilie și mai din momentul evaluării T_{final}, în scopul eliminării riscurilor de apariție în stupine a bolilor bacteriene majore cu manifestări clinice. Nu s-au observat manifestări clinice la puietul de albine, iar loturile martor au fost monitorizate în

perioada martie-mai și nu au prezentat depopulări și mortalități după introducerea tratamentelor profilactice prin turte tratate cu *BacteApis VL2*.

Confirmarea prezenței agenților etiologici prin metode moleculare din conținutul intestinal a avut la bază o metodă standard pentru confirmarea bolilor bacteriene majore prin qRT-PCR, după autorii Dirk de Graaf et al, 2013 - *Standard methods for American foulbrood research*, IBRA Journal of Apicultural Research 52 (1): (2013) (Fig. 7).

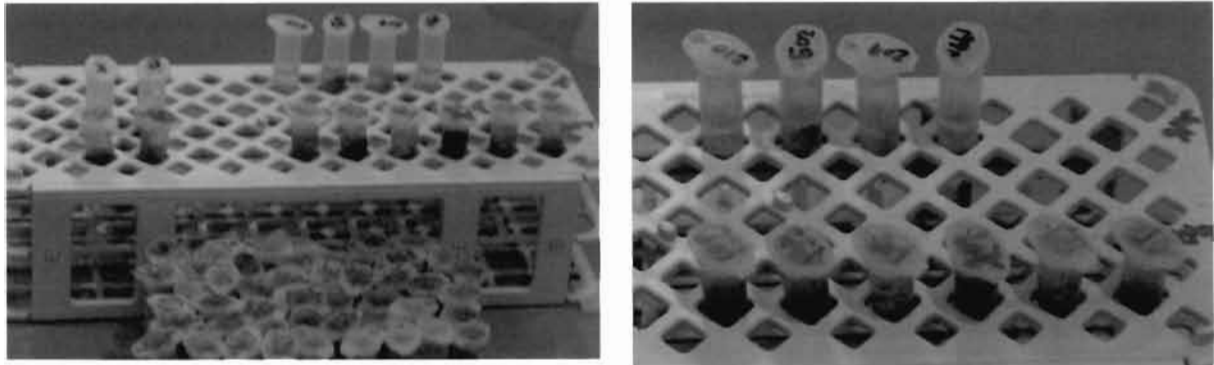


Fig. 7 Probe reprezentate de intestine recoltate de la albine vii clinic sănătoase purtătoare de germeni ai bolilor bacteriene majore, cu sau fără semne clinice de boală, în vederea confirmării prin examen qRT-PCR

Rezultate: metoda originală de diagnostic de confirmare moleculară a fost efectuată cu ajutorul qRT-PCR care a semnalat prezența agenților etiologici specifici pentru bolile bacteriene grave în intestinul albinelor vii la toate cele 6 stupini luate în studiu, confirmând prezența agenților înainte de declansarea bolii la puiet. Martorii pozitivi au fost reprezentați de tulpina de referință standard de *Paenibacillus larvae* (ATCC 9545) și o probă de puiet în care a evoluat loca americană (confirmată de oficial de IDSA).

REZUMAT

Invenția de față se referă la un *produs apifitoterapeutic* cu acțiune bacteriostatică, de uz veterinar, destinat profilaxiei bolilor bacteriene majore provocate de specii ale *Paenibacillus* și *Melisococcus*, la albina *Apis mellifera Carpathica*.

Componentele de bază ale produsului sunt reprezentate de tinctura de *propolis*, extracte hidroalcoolice de *busuioc*, *roiniță oregano* și *vitamina C* și *vitamina B₁₂*.

Compoziția chimică complexă (uleiuri volatile, triterpene, acizi policarboxilici, flavone, taninuri, rășini, vitamine, oligoelemente) îi conferă produsului acțiuni complexe curative: antibacteriene, antiseptice, imunomodulatoare, antiinflamatoare, antioxidante și regenerative.

I. REVENDICARE

Invenția ce face obiectul prezentei cereri de brevet se referă la un produs apifitoterapeutic de uz veterinar, destinat *prevenției bolilor bacteriene majore la albine*, pentru care se formulează următoarele două revendicări:

1. **Denumirea produsului:** *BacteApis VL2* – produs apifitoterapeutic de uz veterinar apicol destinat prevenției bolilor bacteriene majore în familiile de albine»
2. **Compoziția produsului**, respectiv formula farmaceutică a acestuia.

Produsul apifitoterapeutic *BacteApis VL2*, conform invenției, reprezintă o formulă originală ce include principii biologic active de origine naturală, cu activități variate și complexe. Compoziția produsului este originală și valorifică produse ale stupului (propolis) alături de extracte vegetale ale unor specii de plante din flora autohtonă. Produsul are în compoziție: extract de *propolis* (10...25 %), extract hidroalcoolic de *busuioc* (5...32 %), extract hidroalcoolic de *roiniță* (7...41%), extract hidroalcoolic de *oregano* (3-39 %), *vitamina C* (0,1...0,4%) și *vitamina B₁₂* (0,01-0,05 %).
