

UTILIZZO DELL'ASSOCIAZIONE ATOVAQUONE/PROGUANILE CLO-RIDRATO PER IL TRATTAMENTO DELLA MALARIA AVIARE NELLE CIVETTE DELLE NEVI (*BUBO SCANDIACUS*)

Samarelli R.¹, Pugliese N.¹, Lombardi R.^{1,2}, Schiavone A.¹, Circella E.¹, Saleh M.^{1,3}, Cafiero M.⁴, Raelo D.⁴, Siddique I.¹, Camarda A.^{1,2}

¹Università degli Studi di Bari "Aldo Moro", Dipartimento di Medicina Veterinaria, S.P. per Casamassima Km 3, 70010 Valenzano (Bari), Italia

²Osservatorio Faunistico Regionale della Puglia, Via Generale Palmiotti Michele 43, 70020 Bitetto (Bari), Italia.

³Department of Animal Production, Faculty of Agriculture at Moshtohor, Benha University, Qalyubia, Egypt

⁴Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Puglia e Basilicata, via Manfredonia

Summary

Avian malaria is an ubiquitous disease affecting avian species worldwide, caused by parasites belonging to the genus *Plasmodium* (Apicomplexa: *Haemosporida*), and transmitted by *Culicidae* mosquitoes. Within the *Plasmodium* genus, *Plasmodium relictum* is one of the most diffused species.

The disease is characterized by great variability in the effects on the infected birds. Despite the increasing detection of *Plasmodium* spp. infection in birds, and the potentially deleterious effects it may generate in hosts, little knowledge about treatments is available to date.

In human medicine atovaquone/proguanil hydrochloride is one of the most used drugs for the treatment of malaria.

Therefore, the present study is aimed to report the efficacy of treatment with atovaquone/proguanil hydrochloride (AV/PG) administered to three captive-bred snowy owls (*Bubo scandiacus*) housed in a wildlife rescue center in Apulia, Italy, affected by avian malaria.

The AV/PG combination at a dosage of 10.5/4.2 mg/kg was orally administered once a day for three days. After a break of one week, another 3 days treatment course was administered. Blood was collected from the birds at 7, 30, and 60 days after the last AV/PG administration to assess the effectiveness of the treatment and disclose potential relapse.

The hematological parameters were measured before treatments and concurrently with the monitoring period.

No positivity to the parasite was detected until 60 days after the end of the treatment, and no deleterious effect was seen during the observation period.

The presented results suggest that the combination of AV/PG can be used effectively to treat avian malaria by *P. relictum*. Additionally, they provide a dosage that can be safely administered to such valuable birds.

INTRODUZIONE

La malaria aviare è una delle malattie emergenti nell'ambito dell'avifauna selvatica, che potrebbe avere un impatto negativo sul benessere delle popolazioni di uccelli

selvatici detenuti in cattività.

La malattia è sostenuta da parassiti appartenenti al genere *Plasmodium* (Apicomplexa: *Haemosporida*), ed è trasmessa da vettori. Sebbene diverse specie di zanzare appartenenti alla famiglia *Culicidae* siano ritenute vettori del parassita, *Culex pipiens* sembrerebbe essere la specie maggiormente coinvolta nella trasmissione dei plasmodi aviari e nel loro ciclo biologico [1-2]. Anche alla luce dei cambiamenti climatici, che favoriscono la diffusione e la persistenza dei vettori, la malattia ha diffusione pressoché ubiquitaria, ad eccezione per le regioni artiche ed antartiche [3-4]. Ad oggi, si ritiene che siano almeno 55 le specie di plasmodi in grado di indurre la malaria aviare negli uccelli [4]. Tra queste, *Plasmodium relictum* è la più diffusa [5]. Infatti, sono circa 220 le specie di uccelli che possono essere infettate da uno dei 5 principali genotipi di questo parassita, ovvero SGS1, GRW11, GRW4, LZFUS01 e PHCOL01 [4].

Gli uccelli infetti possono manifestare un quadro clinico ampio e variegato, che può variare in funzione della specie colpita e di una serie di fattori, alcuni dei quali tuttora sconosciuti [6-7].

Quale sia l'impatto reale della malaria aviare negli uccelli selvatici liberi in natura non è ben noto. Sono scarsi, infatti, i lavori scientifici di tipo epidemiologico sull'argomento. Ben diversa sembra la situazione nei centri di recupero o negli zoo, dove è noto che la circolazione del parassita può influire pesantemente sulla salute degli animali con grave impatto sulla qualità della vita [8]. La crescente diffusione della malaria aviare e la conseguente attenzione nei suoi confronti [9], ad oggi non hanno determinato la messa a punto di un protocollo terapeutico ben definito di cui sia stata dimostrata l'efficacia a lungo termine. Le informazioni disponibili in letteratura riportano, infatti, una varietà di trattamenti che spesso, però, si sono dimostrati poco efficaci o, in alcuni casi, tossici in alcune specie di uccelli detenuti in cattività [10-11].

In medicina umana, l'associazione farmacologica di atovaquone (AV) e proguanile cloridrato (PG) è tra le più utilizzate nel trattamento della malaria. Entrambe le sostanze sono attive sullo stadio intraeritrocitario del parassita. Nello specifico, l'atovaquone esplica un'azione schizonticida e gametocitocida inibendo il trasporto di elettroni all'interno delle cellule mitocondriali dell'organismo parassita. Il proguanile cloridrato, invece, esplica sia un'azione schizonticida nell'ospite, che di inibitore dello sviluppo delle oocisti all'interno del vettore, andando ad inibire la produzione dei folati necessaria per la sintesi del DNA parassitario. Quest'ultima molecola ha effetto sinergico sull'azione dell'atovaquone, incrementando così l'efficacia del farmaco [12].

Alla luce di tali osservazioni, con il presente studio si è inteso valutare l'efficacia dell'associazione atovaquone/proguanile cloridrato per il trattamento di tre esemplari di civette delle nevi (*Bubo scandiacus*) affette da malaria aviare, ospitate presso l'Osservatorio Faunistico Regionale della Puglia.

MATERIALI E METODI

Descrizione del caso

Tre civette delle nevi (*Bubo scandiacus*), detenute presso l'Osservatorio Faunistico Regionale della Puglia, hanno manifestato sintomatologia clinica aspecifica con anoressia o disoressia, perdita di peso e sanguinamento prolungato a seguito di lesioni accidentali.

I tre soggetti, due maschi e una femmina, avevano un'età compresa tra 5 e 10 anni e peso di circa 1,5 Kg ciascuno. Il loro regime alimentare era costituito da prede vive e alimento congelato rappresentato da colli di pollo, topi e pulcini. Gli animali erano ospitati in voliere all'aperto, costituite da un fondo in muratura e una rete a maglia media sui restanti tre lati della struttura, adiacenti ad altre voliere che ospitavano differenti specie di avifauna. Nonostante la presenza delle reti, la possibilità di contatto degli uccelli con i vettori non era impedita.

A seguito dell'insorgenza dei segni clinici sopra indicati, lo staff veterinario decideva di sottoporre i tre esemplari ad indagini ematologiche e screening per le principali malattie infettive ascrivibili alla sintomatologia manifestata.

Indagini batteriologiche e molecolari

Tutti e tre gli esemplari sono stati sottoposti a indagini per escludere alcune malattie infettive batteriche compatibili con la sintomatologia osservata. Sono stati raccolti, pertanto, campioni di feci per la valutazione della presenza di parassiti intestinali mediante flottazione fecale, oltre che tamponi cloacali e tracheali da sottoporre a esami batteriologici ad ampio spettro [13-14].

Indagini ematologiche

I tre soggetti sono stati sottoposti a prelievo di sangue per la valutazione dei parametri emocromocitometrici e biochimici completi. Lo screening è stato eseguito a T0 (momento della diagnosi) e a T7, T30 e T60 (rispettivamente una settimana, 30 giorni e 60 giorni dopo la fine della somministrazione del farmaco).

Il sangue, nella quantità di 1,5 ml totali, è stato prelevato dalla vena ulnare di ciascun soggetto utilizzando una siringa sterile da 2,5 ml. Del sangue raccolto, 1 ml è stato stoccato in provette per siero con gel separatore (Vacumed® Gel Separator + Cloth Activator), mentre 500 mL sono stati stoccati in provette contenenti litio eparina (Microvette® 500, Litio Eparina, Sarstedt). Il sangue è stato conservato a temperatura di refrigerazione fino alla consegna presso un laboratorio esterno, entro 12 ore dal prelievo.

Ricerca e identificazione dell'emoparassita

Per la diagnosi di malaria aviare, è stata effettuata la purificazione del DNA genomico totale a partire da 30 uL di sangue intero in litio eparina, mediante l'utilizzo del kit ZymoBIOMICS® DNA Miniprep (Zymo Research Corporation, USA), secondo le istruzioni fornite dal produttore. La ricerca degli emoprotozoi è stata effettuata mediante nested-PCR, come precedentemente descritto [15-16]. L'indagine molecolare per la ricerca di emoparassiti dal sangue è stata eseguita in tutte le fasi del campionamento, ovvero a T0, T7, T30 e T60 al fine di verificare l'eventuale persistenza dell'infezione.

Per l'identificazione del parassita, l'amplicone ottenuto è stato purificato mediante l'utilizzo del PureLink™ Quick Gel Extraction & PCR Purification Combo Kit (Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia) e successivamente sequenziato, mediante metodica Sanger, presso le strutture del Microsynth SeqLab (Göttingen, Germania). Per il sequenziamento sono stati utilizzati i primer HAEMF (5'-ATGGTGCTTTC-GATGATCATG-3') e HAEMR2 (5'-GCATTATCTGGATGTATAATGGT-3') [16]. L'analisi dei nucleotidi relativi alle sequenze ottenute è stata condotta con l'ausilio del CLC Sequence Viewer (CLC Bio, Aarhus, Danimarca).

Le sequenze sono state assemblate con l'ausilio del programma online Cap3 Sequence Assembly Program [17] e la sequenza nucleotidica ottenuta è stata confrontata mediante il software Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) con quelle disponibili in GenBank.

Quantificazione molecolare di Plasmodium relictum

Sui campioni risultati positivi è stata messa a punto una qPCR per la quantificazione del parassita nel sangue, disegnando i primers CytbqF (5'-CCTTTAGGGTATGATACAG-3') e CytbqR (5'TTCTGGAACAATATGTAAAGG-3'), e la sonda CytbqP (5'FAM-AAATACCCTTCTATCCAAATCT-3').

Il risultato finale della qPCR è stato espresso in numero di plasmodi per mL di sangue, sulla base del volume di DNA eluito (75 mL) e del volume di DNA utilizzato (2 mL), e normalizzato secondo le informazioni reperibili in letteratura [18], è stata effettuata al momento della diagnosi e successivamente a 7, 30 e 60 giorni dal termine della terapia farmacologica.

Somministrazione di atovaquone/proguanile cloridrato: dosaggio e protocollo terapeutico

Ai soggetti positivi è stata somministrata la combinazione AV/PG 10,5 e 4,2 mg/kg, rispettivamente, in singola somministrazione giornaliera per via orale. Il dosaggio è stato definito adattando i dati disponibili in letteratura [19-20], applicando il criterio del miglior rapporto benefici/rischi, cercando quindi di utilizzare la minima dose efficace.

Il piano terapeutico prevedeva due cicli di somministrazione del farmaco della durata di tre giorni, con un intervallo terapeutico di 7 giorni tra un ciclo e l'altro.

Approvazione del comitato etico

Il progetto di ricerca è stato sottoposto e valutato dal comitato etico del Dipartimento di Medicina Veterinaria che ha espresso parere favorevole (n. 12/2022) alla sua esecuzione.

RISULTATI

Esiti diagnostici ed indagini ematologiche

Tutti e tre i soggetti sono risultati negativi sia per parassiti intestinali che per *Escherichia coli* e *Pasteurella multocida*.

Di contro, tutti e tre i soggetti sono risultati positivi, in nested-PCR, per la ricerca di emoparassiti. Il successivo sequenziamento ha consentito l'identificazione di *Plasmodium relictum*, agente causale della malaria aviaria.

Dalle indagini emocromocitometriche e biomolecolari, nessuna fluttuazione di rilievo dei parametri ematici è stata evidenziata in tutti e tre i soggetti, sia al momento della diagnosi (T0) che a 7, 30 e 60 giorni dal termine della terapia (T7-T30-T60). Dopo il trattamento, si è avuta la scomparsa dei segni clinici senza alcuna recidiva per tutta la durata del monitoraggio.

Quantificazione molecolare di Plasmodium relictum

La curva standard della qPCR ha restituito un'efficienza del 94,5% ed un R^2 pari a 0,999 supportando, così, l'attendibilità dei risultati ottenuti.

La quantificazione del parassita nel sangue ha consentito di evidenziare, al momento della diagnosi, una carica compresa tra $2,99 \times 10^2$ e $4,36 \times 10^3$ plasmodi/mL di sangue (Tab. 1).

Nelle fasi di monitoraggio, già a 7 giorni dal termine della terapia, uno dei tre soggetti è risultato negativo, mentre i restanti due hanno mostrato un brusco abbattimento della carica parassitaria. A 30 giorni e a 60 giorni dal termine della terapia, invece, tutti e tre i soggetti sono risultati negativi (Tab 1).

Tabella 1. Carica di plasmodio rilevata mediante qPCR nel sangue delle civette al momento della diagnosi e durante il monitoraggio.

Soggetto	T0 (N° cell/mL sangue)	T7 (N° cell/mL sangue)	T30 (N° cell/mL sangue)	T60 (N° cell/mL sangue)
Civetta F	$2,99 \times 10^2$	$1,14 \times 10^{-1}$	ND	ND
Civetta M1	$4,36 \times 10^3$	ND	ND	ND
Civetta M2	$7,46 \times 10^2$	$1,62 \times 10^{-1}$	ND	ND

DISCUSSIONE

Le indagini diagnostiche effettuate sui tre esemplari di Civetta delle nevi hanno evidenziato una positività per *P. relictum*, agente responsabile della malaria aviare, mettendo in luce la circolazione del parassita e, presumibilmente, del vettore all'interno del centro di recupero.

La negativizzazione nei confronti del patogeno e la concomitante scomparsa del quadro clinico a seguito del trattamento terapeutico hanno dimostrato l'efficacia della combinazione farmacologica utilizzata, dato supportato dalla quantificazione molecolare effettuata sui tre soggetti. Contestualmente, i valori emocromocitometrici e biochimici non mostravano oscillazioni di rilievo, segno che il trattamento non ha causato sofferenze epatiche, renali o di altro tipo.

Tale risultato non è da sottovalutare, in quanto dimostra la disponibilità di un trattamento sicuro ed efficace per il controllo della malaria aviare utile a contrastare un problema sanitario sempre più pressante. Infatti, centri di recupero e strutture zoologiche spesso ospitano specie, quali le civette delle nevi o gli sfeniscidi che, a causa di una mancata coevoluzione con il parassita, manifestano una spiccata sensibilità nei confronti della malattia [19-21]. A complicare il quadro si aggiungono le difficoltà di controllo del vettore in molte di queste strutture, e la crescente diffusione della malattia anche tra gli animali selvatici.

Sebbene in letteratura siano descritti diversi studi condotti su varie specie, come ad esempio i passeriformi [20], e vengano proposti differenti protocolli terapeutici [10], le informazioni a disposizione sono spesso lacunose, i dosaggi sono talora empirici, approssimativi o addirittura eccessivamente alti, per via delle normative che impediscono di implementare studi farmacologici sulle specie selvatiche e protette. Infine, alcune delle sostanze usate hanno evidenziato effetti tossici di rilievo [11].

In ambito umano, invece, le alternative terapeutiche per il trattamento della malaria sono numerose e ampiamente sperimentate. Uno dei trattamenti farmacologici

di maggiore impiego negli scorsi decenni per la cura della Malaria umana è rappresentato dall'associazione AV/PG [12]. Il trattamento ha restituito per anni ottimi risultati con effetti collaterali non particolarmente marcati, sebbene ad oggi il suo utilizzo sia ridotto a causa dell'insorgenza di resistenze al farmaco da parte di alcune popolazioni di plasmodi [22].

CONCLUSIONI

Questo studio ha cercato di compendiare le informazioni disponibili in ambito medico umano e veterinario in modo da proporre un trattamento con AV/PG efficace e sicuro nel trattamento della malaria aviaria nelle civette delle nevi. Si rendono necessarie, ad ogni modo, ulteriori indagini per la valutazione dell'efficacia del farmaco su un campione più ampio di animali, appartenenti sia a questa che ad altre specie di uccelli sensibili, verificando nel contempo se l'efficacia del trattamento possa essere influenzata da resistenze naturali al farmaco nelle popolazioni di plasmodi aviari così come sembra avvenire per i plasmodi responsabili della malaria umana.

BIBLIOGRAFIA

1. Valkiūnas G and TA Iezhova. (2018). Keys to the avian malaria parasites. *Malar. J.* 17: 212.
2. Valkiūnas G. (2005). *Avian malaria parasites and other haemosporidia*. CRC Press, Boca Raton, FL, US.
3. Fecchio A, Chagas CRF, Bell JA and K Kirchgatter. (2020). Evolutionary ecology, taxonomy, and systematics of avian malaria and related parasites. *Acta Trop.* 204: 105364.
4. MalAvi database <http://130.235.244.92/Malavi/index.html>
5. Martínez-de la Puente J, Santiago-Alarcon D, Palinauskas V and S Bensch. (2021). *Plasmodium relictum*. *Trends Parasitol.* 37: 355-356.
6. Valkiūnas G, Ilgūnas M, Bukauskaitė D, Fragner K, Weissenböck H, Atkinson CT and TA Iezhova. (2018). Characterization of *Plasmodium relictum*, a cosmopolitan agent of avian malaria. *Malar. J.* 17: 184.
7. Dimitrov D, Palinauskas V, Iezhova TA, Bernotienė R, Ilgūnas M, Bukauskaitė D, Zehtindjiev P, Ilieva M, Shapoval AP, Bolshakov CV, Markovets MY, Bensch S and G Valkiūnas. (2015). *Plasmodium* spp.: an experimental study on vertebrate host susceptibility to avian malaria. *Exp. Parasitol.* 148: 1-16.
8. McClure KM, Fleischer RC and Kilpatrick AM. (2020). The role of native and introduced birds in transmission of avian malaria in Hawaii. *Ecology.* 101: 03038.
9. Lapointe DA, Atkinson CT and MD Samuel. (2012). Ecology and conservation biology of avian malaria. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1249: 211-26.
10. Grilo ML, Vanstreels RE, Wallace R, García-Párraga D, Braga ÊM, Chitty J, Catão-Dias JL and LM Madeira de Carvalho. (2016). Malaria in penguins - current perceptions. *Avian Pathol.* 45: 393-407.
11. Ross M, Avni-Magen N, Pe'er O, Berkowitz A and R Ofri. (2021). Treatment with chloroquine is retinotoxic in captive African penguins (*Spheniscus demersus*). Attenuation and recovery of electroretinographic responses. *Vet. Ophthalmol.* 24: 336-345.

12. Looareesuwan S, Chulay JD, Canfield CJ and DB Hutchinson DB. (1999). Malarone (atovaquone and proguanil hydrochloride): a review of its clinical development for treatment of malaria. Malarone Clinical Trials Study Group. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60: 533-541.
13. Suay-García B, Galán F, Rodríguez-Iglesias MA and MT Pérez-Gracia. (2019). Detection and characterization of extended-spectrum beta-lactamases-producing *Escherichia coli* in animals. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 19: 115-120.
14. Tang X, Zhao Z, Hu J, Wu B, Cai X, He Q and H Chen. (2009). Isolation, antimicrobial resistance, and virulence genes of *Pasteurella multocida* strains from swine in China. *J. Clin. Microbiol.* 47: 951-958.
15. Bensch S, Stjernman M, Hasselquist D, Ostman O, Hansson B, Westerdahl H and RT Pinheiro. (2000). Host specificity in avian blood parasites: a study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds. *Proc. Biol. Sci.* 267: 1583-1589.
16. Hellgren O, Waldenström J and S Bensch. (2004). A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. *J. Parasitol.* 90: 797-802.
17. Huang X and A Madan. (1999). CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res.* 9: 868-877.
18. Koepfli C, Nguiragool W, Hofmann NE, Robinson LJ, Ome-Kaius M, Sattabongkot J, Felger I and I Mueller. (2016). Sensitive and accurate quantification of human malaria parasites using droplet digital PCR (ddPCR). *Sci. Rep.* 6: 39183.
19. Lee SH, Kwak D and KT Kim. (2018). The first clinical cases of *Haemoproteus* infection in a snowy owl (*Bubo scandiacus*) and a goshawk (*Accipiter gentilis*) at a zoo in the Republic of Korea. *J. Vet. Med. Sci.* 80: 1255-1258.
20. Palinauskas V, Valkiūnas G, Krizanauskiene A, Bensch S and CV Bolshakov. (2009). *Plasmodium relictum* (lineage P-SGS1): Further observation of effects on experimentally infected passeriform birds, with remarks on treatment with Malarone. *Exp. Parasitol.* 123: 134-139.
21. Ings K and D Denk. (2022). Avian malaria in penguins: Diagnostics and future direction in the context of climate change. *Animals.* 12: 600.
22. Staines HM, Burrow R, Teo BH, Chis Ster I, Kremsner PG and S Krishna. (2018). Clinical implications of *Plasmodium* resistance to atovaquone/proguanil: a systematic review and meta-analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* 73: 581-595.

RINGRAZIAMENTI

La presente ricerca è stata realizzata con il contributo del Ministero della Salute nell'ambito del progetto RC IZSPB 01/2021.