



圈养珍稀鹤类长疟原虫流行情况研究

蒋鹏, 郑常明, 姜瑞婕, 杜余礼, 卢岩,
刘燕, 张增帅, 赵京, 孙冬婷, 赵素芬*, 贾婷*

(北京动物园, 圈养野生动物技术北京市重点实验室, 北京, 100044)

稿件运行过程

收稿日期: 2023-05-08

修回日期: 2023-07-12



关键词: 珍稀鹤类;
长疟原虫;
流行;
疾病防控

Key words: Rare cranes;
Plasmodium elongatum;
Prevalence;
Disease control

中图分类号: S858.9

文献标识码: A

文章编号:

2310-1490(2024)-02-0347-07

DOI: 10.12375/ysdwx.20240214

摘要

2017—2021年,收集5家饲养单位12种圈养珍稀鹤类的284份样品进行血孢子虫病的流行调查。采用血孢子虫细胞色素***b***(*Cyt b*)基因套式PCR检测和Blast序列比对,结果显示:血孢子虫基因序列与已知长疟原虫(*Plasmodium elongatum*)DENVID02进化支匹配度达到100%;结合虫体形态学,确定该寄生虫所属类群为长疟原虫。长疟原虫在黑颈鹤(*Grus nigricollis*)、白鹤(*Leucogeranus leucogeranus*)、丹顶鹤(*Grus japonensis*)、白头鹤(*G. monacha*)、灰鹤(*G. grus*)和白枕鹤(*Antigone vipio*)6种鹤类中被检出,检出率为8.45%(24/284)。此外,感染长疟原虫DENVID02进化支的鹤类个体未出现明显的临床症状,所有感染个体均未采取防治措施。在跟踪监测中,发现病原体在鹤类体内消失或呈跨年度携带现象,推测鹤类可能对长疟原虫DENVID02具有先天抵抗力。

Investigation on Prevalence of *Plasmodium elongatum* in Captive Rare Cranes

JIANG Peng, ZHENG Changming, JIANG Ruijie,
DU Yuli, LU Yan, LIU Yan, ZHANG Zengshuai,
ZHAO Jing, SUN Dongting, ZHAO Sufen*, JIA Ting*

(Beijing Zoo, Beijing Key Laboratory of Captive Wildlife Technologies,
Beijing, 100044, China)

基金项目: 北京动物园管理处野生鸟类血孢子虫检测平台

第一作者简介: 蒋鹏(1981—),女,畜牧师;主要从事野生动物保护、野生动物疫病防治研究。E-mail:jiangpeng169@163.com

*通信作者: 赵素芬, E-mail:zhaosufen111@126.com;贾婷, E-mail:jiating_2005@163.com

Abstract: To investigate the prevalence of Haemosporidia, the present study collected 284 samples from 12 species of captive rare cranes in five crane breeding bases from 2017 to 2021. Using nested PCR of the cytochrome *b* (*Cyt b*) gene and Blast sequence alignment, the results showed that the sequence of the *Haemoproteus* parasites was 100% similarity in comparison with *Plasmodium elongatum* (lineage DENVID02) by Blast. Combined with the morphology of the parasite, it was determined that the parasite belongs to *P. elongatum*. *P. elongatum* (lineage DENVID02) was detected in the six crane species, including black-necked crane (*Grus nigricollis*), Siberian crane (*Leucogeranus leucogeranus*), red crowned crane (*Grus japonensis*), hooded crane (*G. monacha*), common crane (*G. grus*), and white-naped crane (*Antigone vipio*), with a total detection rate of 8.45% (24/284). In addition, the infected crane individuals did not show obvious clinical symptoms, and no treatment measures for the parasites were taken. In the follow-up monitoring, *P. elongatum* disappeared in one year or two years. All these indicated that the above cranes had innate resistance to the parasite.

血液寄生虫严重影响鸟类健康状况,症状表现在生理、行为等多个方面,可能使寄主的适合度降低,是导致物种灭绝的原因之一^[1-2]。在各类血液寄生虫的研究中,以血孢子虫最为深入^[3]。能感染鸟类的血孢子虫目(Haemosporidia)有3属,分别为疟原虫属(*Plasmodium*)、血变原虫属(*Haemoproteus*)和住白细胞原虫属(*Leucocytozoon*)^[4],通常通过吸血蚊虫传播^[5]。疟原虫是一种呈全球性分布的血液寄生虫,已报道的疟原虫种类多达200余种^[6],通过形态学特征进行明确鉴定的鸟类疟原虫已有55种^[7]。长疟原虫(*Plasmodium elongatum*)已在多种鸟类中被检出,包括企鹅目(Sphenisciformes)、雀形目(Passeriformes)和无翼鸟目(Apterygiformes)等^[8-10]。

鹤被称为评估湿地生态系统健康的“旗舰物种”^[11]。我国是世界上拥有鹤种类最多的国家之一^[12],其中,白鹤(*Leucogeranus leucogeranus*)、白枕鹤(*Antigone vipio*)、赤颈鹤(*A. antigone*)、黑颈鹤(*Grus nigricollis*)、白头鹤(*G. monacha*)和丹顶鹤(*G. japonensis*)为国家一级重点保护野生动物^[13]。我国鹤类寄生虫性疾病发病数量占鹤类疾病发病数量的26.15%,尤其是幼鹤感染血孢子虫后致死率较高^[14-16]。已有报道指出,长疟原虫会对非适应性鸟类的健康造成威胁^[8-10,17-19],典型易感动物为麦哲伦企鹅(*Spheniscus magellanicus*),其在圈养种群中传播会导致高发病率和快速死亡^[20-21]。然而长疟原虫在圈养鹤类中的感染情况尚未被报道。2017—2021年,以5家饲养单位12种珍稀鹤类的血液或组织样品为研究对象,采用形态学和分子生物学等方法分

析样品中长疟原虫的感染情况,以期指导生产实践,促进珍稀鹤类种群健康发展。

1 材料与方 法

1.1 样品采集与处理

采集北京动物园十三陵繁育研究基地(以下简称“北京动物园”)、南京红山森林动物园、保定动物园、杭州动物园和太原动物园12种珍稀鹤类的血液或组织,共284份样品(表1)。将新鲜血液样品分为2份,1份用于制备血涂片,另1份置于EDTA抗凝管内,-80℃保存备用;将新鲜组织样品制备成组织触片后,-80℃保存备用。血涂片及脏器触片经甲醇固定后,室温存放备用。

1.2 DNA提取、扩增、测序和序列分析

按照Ezup柱式血液基因组DNA抽提试剂盒(B518253-0050,生工生物工程(上海)股份有限公司)和Ezup柱式动物基因组DNA抽提试剂盒(B518251-0050,生工生物工程(上海)股份有限公司)的使用说明进行血液及组织样品的DNA提取。

采用巢式PCR法,扩增鸟类血液和组织寄生虫细胞色素*b*(*Cyt b*)基因片段^[22]。第1轮扩增引物为F(5'-CATATATTAAGAGAAITATGGAG-3';I为通用碱基,次黄(嘌呤核)苷)和R(5'-ATAGAAAGATAAG-AAATACCATTC-3')。反应体系20μL,包括2×*Taq*酶混合溶液(B639295,Life Biotech,India Delhi)10μL,F、R各1μL,ddH₂O 6μL,模板DNA 2μL。第1轮扩增反应程序:94℃模板变性3min;94℃产物变性30s,50℃退火30s,72℃引物延伸45s,20个循环;

72 °C 延伸 10 min。第 2 轮扩增引物为 F(5'-ATG-GTGCTTTTCGATATATGCATG-3') 和 R(5'-GCATTA-TCTGGATGTGATAATGGT-3')。反应体系 25.0 μL, 包含 2×Taq 酶混合溶液 12.5 μL, F、R 各 1.0 μL, ddH₂O 8.5 μL, 模板 DNA 2.0 μL, 模板为第 1 轮扩增产物。第 2 轮扩增反应程序: 94 °C 模板变性 3 min; 94 °C 产物变性 30 s, 50 °C 退火 30 s, 72 °C 引物延伸

45 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。用 1.5% 琼脂糖凝胶对 5 μL 第 2 轮扩增产物进行电泳检测, 凝胶用 4S Green Plus 无毒核酸凝胶染液(生工生物工程(上海)股份有限公司)染色, 在凝胶成像仪(GenoSens 1800, Clinx Science Instruments)中观察结果。电泳检测为阳性的样品, 送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行双向测序。所有样品均重复检测 3 次。

表 1 珍稀鹤类样品采集信息(2017—2021 年)

Tab. 1 Sample collection from rare cranes(2017—2021)

采样时间 Sampling time	饲养单位 Feeding unit	物种(数量) Species and number	样本总量 Total number of samples	样品种类 Sample type
2017-10-27	北京动物园	丹顶鹤(<i>Grus japonensis</i> , 11)、白鹤(<i>Leucogeranus leucogeranus</i> , 10)、白枕鹤(<i>Antigone vipio</i> , 4)、黑颈鹤(<i>Grus nigricollis</i> , 6)、肉垂鹤(<i>Bugeneranus carunculatus</i> , 3)、赤颈鹤(<i>Antigone antigone</i> , 2)、蓝鹤(<i>Anthropoides paradiseus</i> , 4)、灰冠鹤(<i>Balearica regulorum</i> , 6)、黑冠鹤(<i>Balearica pavonina</i> , 7)	53	血液
2017-11-27	南京红山森林动物园	丹顶鹤(2)、黑冠鹤(1)、白枕鹤(1)、白鹤(1)、蓑羽鹤(<i>Anthropoides virgo</i> , 1)	6	血液
2017-12-16	保定动物园	丹顶鹤(5)、灰鹤(<i>Grus grus</i> , 1)	6	血液
2018-06-15	杭州动物园	死亡丹顶鹤(1)	1	组织
2018-08-23	北京动物园	死亡黑颈鹤(1)	1	组织
2018-08-28	北京动物园	死亡黑颈鹤(1)	1	组织
2018-09-26	太原动物园	蓑羽鹤(6)	6	血液
2018-11-07	北京动物园	丹顶鹤(10)、白鹤(9)、白枕鹤(7)、黑颈鹤(8)、肉垂鹤(3)、赤颈鹤(2)、蓝鹤(4)、灰冠鹤(3)、黑冠鹤(4)	50	血液
2019-06-26	北京动物园	丹顶鹤(1)、白枕鹤(2)、黑颈鹤(2)、灰冠鹤(5)	10	血液
2019-10-23	北京动物园	丹顶鹤(14)、白鹤(10)、白枕鹤(10)、黑颈鹤(8)、蓝鹤(1)、肉垂鹤(3)、赤颈鹤(2)、灰冠鹤(1)、黑冠鹤(7)、白头鹤(<i>Grus monacha</i> , 2)	58	血液
2020-08-28	北京动物园	白鹤(11)、白枕鹤(7)、黑颈鹤(13)、白头鹤(1)	32	血液
2021-09-23	北京动物园	丹顶鹤(11)、黑颈鹤(11)、黑冠鹤(8)、灰冠鹤(2)、白鹤(9)、白枕鹤(5)、灰鹤(4)、白头鹤(4)、蓝鹤(3)、蓑羽鹤(2)、肉垂鹤(1)	60	血液

计算珍稀鹤类某种疟原虫的感染率, 感染率=某种疟原虫阳性样品数/检测总样品数×100%。将双向测序的序列拼接后, 与 MalAvi 数据库 (Version 2.5.6, <http://130.235.244.92/Malavi/about.html>) 和 NCBI 数据库中的 Blast 模块进行比对, 鉴定血液寄生虫所属类群^[23], DNA 序列相似度达到 100% 的归为相同进化支。多序列比对使用 ClustalX 1.83 软件。

1.3 血涂片检测

使用瑞氏-吉姆萨染液(417101, 珠海贝索生物技术有限公司)将固定的血涂片和组织触片染色 15 min, 双蒸水漂浮后流水冲洗, 风干后在光学显微镜下观察。先在 40×物镜下找到目标位置, 再用 60×油镜检测, 判断个体是否感染血孢子虫以及寄生虫的形态特征, 判断血孢子虫所属类群, 每个血涂片观察 100 个视野^[8]。

2 结果

2.1 长疟原虫序列分析

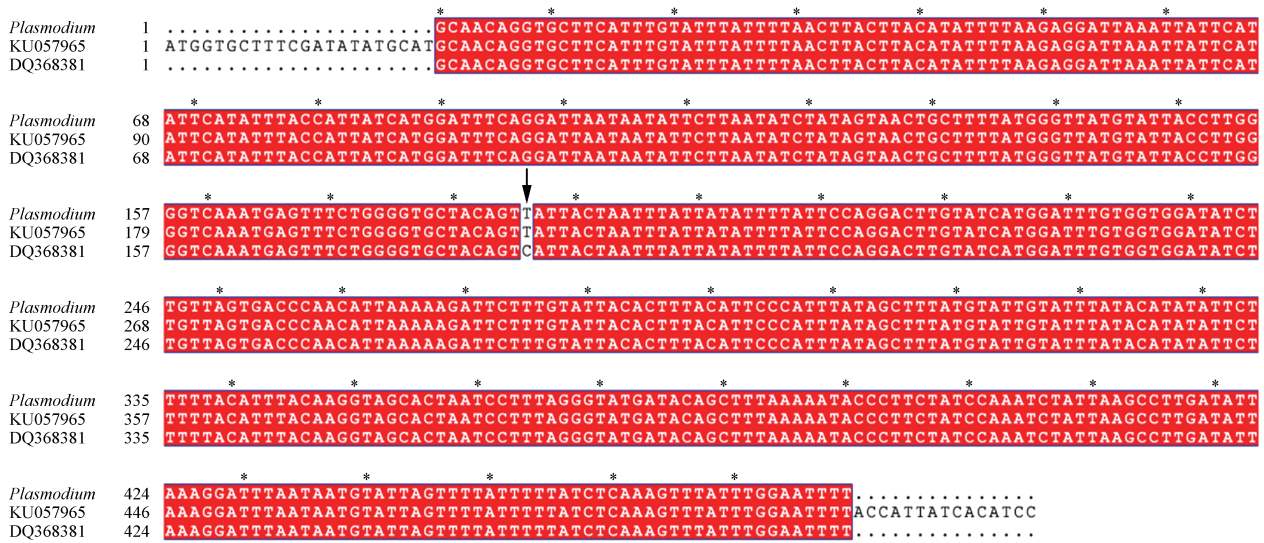
经巢式 PCR 法检测、序列拼接和比对分析后, 发现寄生虫所属类群为长疟原虫。Cyt b 扩增部分序列长度为 479 bp, 与 DENVID02 进化支 (GenBank 登录号: KU057965) 匹配度达 100%, 与 pGRW6 进化支 (GenBank 登录号: DQ368381) 仅有 1 个碱基差异, 即 C 转换为 T (图 1)。

2.2 长疟原虫形态学特征

经外周血涂片瑞氏-吉姆萨染色镜检, 发现红细胞内裂殖体和配子体的形态符合长疟原虫的特征^[24]。寄生于红细胞中的长疟原虫早期滋养体形态不规则, 边缘偶有轻微变形 (图 2A)。裂殖体 (图 2B~D) 常见于成熟红细胞中, 疟色素呈棕黑色, 常聚

集成一个团块;在成熟裂殖体中,裂殖子的数量从2个到11个不等,呈圆形或椭圆形,有时形状不规则;当裂殖子数量多达十几个时,裂殖体体积较大,可占据宿主细胞浆一半的空间,使宿主细胞核移位

(图2D)。大配子体(图2E)、小配子体(图2F)形状细长,边缘粗糙,细胞质中有多个疟色素颗粒;大配子体细胞质蓝染,较小配子体染色深。

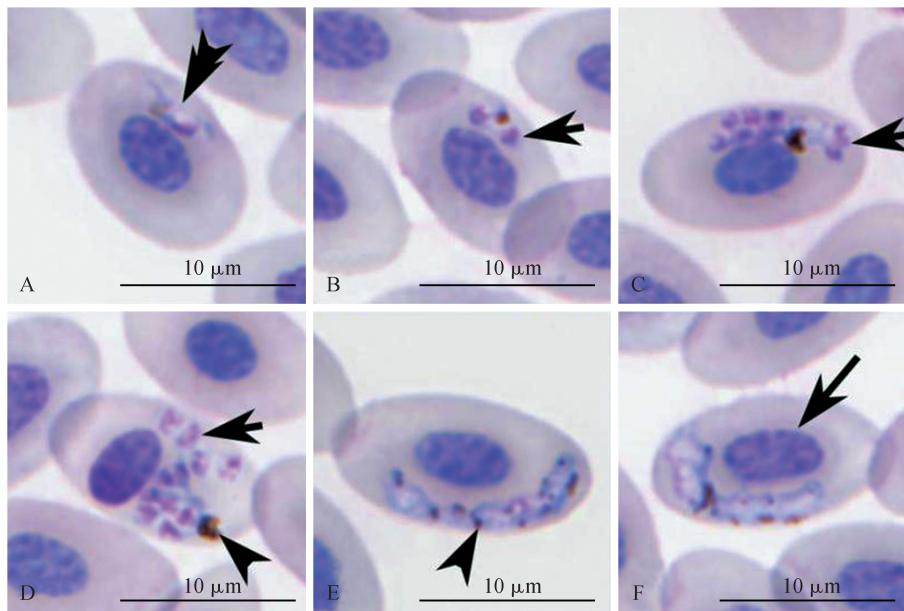


Plasmodium. 本次鹤类样本检出的长疟原虫序列;KU057965. NCBI数据库DENVID02分支序列登录号;DQ368381. NCBI数据库pGRW6序列登录号。黑色箭头为差异碱基。

Plasmodium. The sequence of Plasmodium elongatum detected in crane samples; KU057965. GenBank accession number of DENVID02; DQ368381. GenBank accession number of pGRW6. The black arrows are different bases.

图1 长疟原虫序列比对结果

Fig. 1 Multiple sequence alignment of Plasmodium elongatum



A. 红内期滋养体; B-D. 红内期裂殖体; E. 红内期大配子体; F. 红内期小配子体。“无柄双箭头”示滋养体;“短柄箭头”示裂殖子;“长柄箭头”示宿主细胞核;“无柄单箭头”示疟色素(血涂片,瑞氏-吉姆萨染色,600×)。

A. Endoerythrocytic trophozoite; B-D. Endoerythrocytic schizont; E. Macrogametocyte; F. Microgametocyte. Double arrowhead represents trophozoite; Short simple arrow represents merozoite; Long simple arrow represents host cell nuclei; Arrowheads represents pigment granule (Giemsa-stained thin blood smear, 600×).

图2 长疟原虫形态特征

Fig. 2 Morphological characteristics of Plasmodium elongatum

2.3 长疟原虫感染情况

分析发现5家动物园284份珍稀鹤类样本中,有24个样本感染了长疟原虫,检出率为8.45%。阳性样品均来自北京动物园,包括黑颈鹤(n=11)、白鹤(n=3)、白头鹤(n=3)、丹顶鹤(n=2)、灰鹤(*Grus grus*, n=2)和白枕鹤(n=2)共计6个物种23只个体,且感染个体均未出现临床症状及发病死亡现象。其他4家动物园的鹤类样本未检测出长疟原虫。对采样年份、个体来源、年龄及性别等信息进行分析,发现:

(1)2017—2021年,北京动物园均有鹤类呈长疟原虫阳性,2017、2018、2019、2020、2021年阳性样本数分别为3、4、2、1、14;在感染的23只个体中,22只个体呈单一年份感染,而2018年出壳的黑颈鹤(7Q045)在当年和次年均呈阳性,2020年转为阴性;(2)野生个体和圈养出生个体均可被感染;(3)幼体(<1岁)、亚成体(1~4岁)和成体(≥4岁)均可被感染;(4)在感染的23只个体中,16只为雌性,7只为雄性(表2)。

表2 北京动物园珍稀鹤类长疟原虫检测情况(2017—2021年)
Tab. 2 Detection of *Plasmodium elongatum* in the rare cranes at Beijing Zoo (2017–2021)

种类 Species	编号 Number	采样年份 Year of collection					感染年龄/岁 Age of infection	性别 Gender	备注 Notes
		2017	2018	2019	2020	2021			
黑颈鹤 <i>Grus nigricollis</i>	77148	+	×	×	×	×	未知	♀	C
黑颈鹤 <i>Grus nigricollis</i>	Q0009	-	+	×	-	×	未知	♂	B
黑颈鹤 <i>Grus nigricollis</i>	Q0010	+	-	-	-	-	未知	♂	B
黑颈鹤 <i>Grus nigricollis</i>	Q0011	×	+	×	×	×	未知	♀	B
黑颈鹤 <i>Grus nigricollis</i>	7Q045		+	+	-	×	<1	♀	A
黑颈鹤 <i>Grus nigricollis</i>	仔1				+	×	0	♀	A
黑颈鹤 <i>Grus nigricollis</i>	7N029	×	×	×	×	+	1	♂	A
黑颈鹤 <i>Grus nigricollis</i>	7N020	×	×	×	×	+	1	♀	A
黑颈鹤 <i>Grus nigricollis</i>	7N081	×	×	×	×	+	1	♀	A
黑颈鹤 <i>Grus nigricollis</i>	7N093	×	×	×	-	+	2	♀	A
黑颈鹤 <i>Grus nigricollis</i>	7N025	×	×	×	×	+	2	♀	A
白鹤 <i>Leucogeranus leucogeranus</i>	Q0015	+	-	×	-	×	26	♀	A
白鹤 <i>Leucogeranus leucogeranus</i>	5Q647	×	+	-	-	-	3	♀	A
白鹤 <i>Leucogeranus leucogeranus</i>	Q0072	-	-	-	-	+	38	♀	A
丹顶鹤 <i>Grus japonensis</i>	Q0088	-	-	+	-	×	2	♂	A
丹顶鹤 <i>Grus japonensis</i>	Q198	×	×	×	×	+	24	♂	A
白头鹤 <i>Grus monacha</i>	7M036	×	×	×	×	+	2	♂	A
白头鹤 <i>Grus monacha</i>	7M037	×	×	×	×	+	2	♀	A
白头鹤 <i>Grus monacha</i>	D0028	×	×	×	×	+	未知	♀	C
灰鹤 <i>Grus grus</i>	7N042	×	×	×	×	+	未知	♀	D
灰鹤 <i>Grus grus</i>	7M014	×	×	×	×	+	未知	♀	C
白枕鹤 <i>Antigone vipio</i>	7Q092	×	-	-	×	+	3	♂	A
白枕鹤 <i>Antigone vipio</i>	5Q643	×	×	×	×	+	10	♀	A
阳性个体/只 Infected individual		3	4	2	1	14			

注：“+”示长疟原虫检测阳性；“-”示长疟原虫检测阴性；“×”示该个体当年未采样。“采样年份”纵列空白示个体当年未出生；“仔1”为2020年初生个体，采样时无环号。“A”示圈养出生；“B”示野外来源；“C”示引进；“D”示捐赠。野外来源、引进和捐赠个体出壳日期不详。

Note：“+” indicates a positive test for *Plasmodium elongum*；“-” indicates a negative test for *Plasmodium elongum*；“×” indicates that the individual was not sampled in that year. The “year of collection” column blank indicates that the individual was not born in that year；“仔1” is an individual born in early 2020, no number at the time of sampling. “A” indicates born in captivity；“B” indicates wild source；“C” indicates introduced；“D” indicates “donated”. The dates of birth of the introduced and donated individuals are unknown.

3 讨论

北京动物园圈养的黑颈鹤、白鹤、白头鹤、丹顶鹤、灰鹤和白枕鹤感染的长疟原虫(DENVID02)进化支仅在巴西圣保罗动物园的白脸树鸭(*Dendrocygna viduata*)和北京地区的戈氏岩鹀(*Emberiza godlewskii*)样本中被检出^[25-26]。通过比对 DENVID02 与 pGRW6 的 *Cyt b* 序列,仅有 1 个碱基差异(图 1)。pGRW6 进化支在除澳大利亚和南极洲外的其他地区均有分布,鸟类宿主范围有 60 余种^[24]。此外, DENVID02 的分布和宿主范围显著少于 pGRW6,且该进化支的发现和研究所晚于 pGRW6,因此,学者推测 DENVID02 是由 pGRW6 进化所得^[26]。本研究检出的 DENVID02 进化支基因序列与北京地区的雀形目戈氏岩鹀中报道^[26]的进化支序列一致(图 1),推测该进化支可能已经在北京地区,甚至向周边其他地区传播,但这一推测需要进一步扩大宿主和地域监测范围来验证。本研究中长疟原虫 DENVID02 的形态学数据显示,红细胞内裂殖体和配子体的形态特征符合长疟原虫的特征,同时发现存在大量含 2 个裂殖子的成熟裂殖体,这区别于金丝雀(*Serinus canaria*)长疟原虫的形态^[24],引起圈养鹤类长疟原虫(DENVID02)进化支形态学特征发生变化的因素有待进一步验证。

长疟原虫不同进化支对鸟类的致病性存在显著差异,侵染非适应性鸟类种群时,如麦哲伦企鹅和几维鸟(*Apteryx mantelli*)感染 pGRW6 进化支可能出现严重的临床症状,甚至死亡^[20-21,27],然而,当紫翅椋鸟(*Sturnus vulgaris*)和红交嘴雀(*Loxia curvirostra*)感染 pGRW6 进化支时,却无明显致病性,推测这两种鸟可能具有先天抗性^[28]。长疟原虫(GenBank 登录号:DQ659588)在新西兰鞍背鹑(*Philesturnus carunculatus*)中被检出,单独感染无明显致病性^[29]。新西兰马尔伯勒海峡 2 个近海岛屿在 2002 年和 2007 年曾爆发鞍背鹑大量死亡事件,原因是禽痘病毒和长疟原虫混合感染导致^[30]。本研究中,圈养黑颈鹤、白鹤和丹顶鹤等感染长疟原虫(DENVID02)后,并未发病和死亡,且感染个体未经治疗即自愈,因此推测这几类鹤对此长疟原虫有一定的抵抗力。当发现鹤类感染长疟原虫(DENVID02)后,如无临床症状,无需采取干预措施,但建议对感染个体实施跟踪监测,及时了解动物健康状况,避免出现因抵抗力下降所致

的继发或混合感染现象。

本研究于 2017—2021 年共检测 12 种鹤类,其中,在黑颈鹤、白鹤、白头鹤、丹顶鹤、灰鹤和白枕鹤 6 种鹤类中检出感染个体,而其他鹤类并未检出,推测不同鹤类是否感染长疟原虫可能与动物自身的易感性有关,未来需进一步研究验证。本研究发现,不同年龄和不同性别的鹤类个体均可感染长疟原虫(DENVID02),今后可持续关注感染长疟原虫的个体状态,为进一步研究长疟原虫在珍稀鹤类中的流行特点积累数据。综上,未来应扩大监测范围,特别是要加强对动物园、保护区的圈养鸟类及野生鸟类血孢子虫的主动监测力度,了解血孢子虫病的流行特点,探讨病原、宿主与传播媒介间的相互依存关系,提出有针对性的防治措施,以期对疾病防控和预警提供科学依据。

参考文献:

- [1] CLARK N J, CLEGG S M, LIMA M R. A review of global diversity in avian haemosporidians (*Plasmodium* and *Haemoproteus*: Haemosporida): new insights from molecular data [J]. International Journal for Parasitology, 2014, 44(5): 329-338.
- [2] INUMARU M, NISHIUMI I, KAWAKAMI K, et al. A widespread survey of avian haemosporidia in deceased wild birds of Japan: the hidden value of personally collected samples [J]. The Journal of Veterinary Medical Science, 2022, 84(9): 1253-1260.
- [3] HATCHWELL B J, WOOD M J, ANWAR M, et al. The prevalence and ecology of the haematozoan parasites of European blackbirds, *Turdus merula* [J]. Canadian Journal of Zoology, 2000, 78(4): 684-687.
- [4] 李榴佳, 黄兵, 舒凡帆, 等. 我国鸟类原虫种类与感染状况研究进展 [J]. 中国动物传染病学报, 2013, 21(4): 75-86. LI L J, HUANG B, SHU F F, et al. Research progress on protozoan species and infection status in birds in China [J]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases, 2013, 21(4): 75-86.
- [5] SANTIAGO-ALARCON D, PALINAUSKAS V, SCHAEFER H M. Diptera vectors of avian Haemosporidian parasites: untangling parasite life cycles and their taxonomy [J]. Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society, 2012, 87(4): 928-964.
- [6] SATO S. *Plasmodium*-a brief introduction to the parasites causing human malaria and their basic biology [J]. Journal of Physiological Anthropology, 2021, 40(1): 1.
- [7] VALKIŪNAS G, IEZHOVA T A. Keys to the avian malaria parasites [J]. Malaria Journal, 2018, 17(1): 212.
- [8] GULLIVER E, HUNTER S, HOWE L, et al. The pathology of fatal avian malaria due to *Plasmodium elongatum* (GRW6) and *Plasmodium matutinum* (LINN1) infection in New Zealand kiwi (*Apteryx* spp.) [J]. Animals, 2022, 12(23): 3376.

- [9] PALINAUSKAS V, ŽIEGYTĖ R, ŠENGAUT J, *et al.* Different paths-the same virulence: experimental study on avian single and co-infections with *Plasmodium relictum* and *Plasmodium elongatum* [J]. *International Journal for Parasitology*, 2018, 48(14): 1089-1096.
- [10] SIJBRANDA D C, HUNTER S, HOWE L, *et al.* Cases of mortality in little penguins (*Eudyptula minor*) in New Zealand associated with avian malaria [J]. *New Zealand Veterinary Journal*, 2017, 65(6): 332-337.
- [11] HOWE L, CASTRO I C, SCHOENER E R, *et al.* Malaria parasites (*Plasmodium* spp.) infecting introduced, native and endemic New Zealand birds [J]. *Parasitology Research*, 2012, 110(2): 913-923.
- [12] 曾昭文, 胡咏海, 叶东旭, 等. 中国鹤类现状及保护 [J]. *国土与自然资源研究*, 2003(2): 79-81.
- ZENG Z W, HU Y H, YE D X, *et al.* The status and conservation of Cranes in China [J]. *Territory & Natural Resources Study*, 2003(2): 79-81.
- [13] 国家林业和草原局, 农业农村部. 国家重点保护野生动物名录(2021年2月1日修订) [J]. *野生动物学报*, 2021, 42(2): 605-640.
- National Forestry and Grassland Administration, Ministry of Agriculture and Rural Affairs. List of national key protected wild animals (revised on February 1, 2021) [J]. *Chinese Journal of Wildlife*, 2021, 42(2): 605-640.
- [14] 张成林, 刘燕, 贾婷, 等. 中国鹤类动物发生疾病统计分析 [J]. *野生动物*, 2012, 33(6): 345-349.
- ZHANG C L, LIU Y, JIA T, *et al.* Statistical analysis of diseases of cranes in China [J]. *Chinese Journal of Wildlife*, 2012, 33(6): 345-349.
- [15] 贾婷, 张成林, 刘贤勇, 等. 幼丹顶鹤感染血孢子虫的PCR鉴定 [J]. *野生动物*, 2010, 31(6): 323-326; 337.
- JIA T, ZHANG C L, LIU X Y, *et al.* PCR determination of haemosporidian parasites, infecting juvenile red-crowned crane in Beijing Zoo [J]. *Chinese Journal of Wildlife*, 2010, 31(6): 323-326; 337.
- [16] 贾婷, 张成林, 罗毅, 等. 残疟原虫致肉垂鹤和蓝鹤死亡病例 [J]. *中国兽医杂志*, 2014, 50(1): 42-44; 52.
- JIA T, ZHANG C L, LUO Y, *et al.* Death cases of *Bugeranus carunculatus* and *Anthropoides paradiseus* caused by plasmodium falciparum [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2014, 50(1): 42-44; 52.
- [17] CRANFIELD M R, GRACZYK T K, BEALL F B, *et al.* Sub-clinical avian malaria infections in African black-footed penguins (*Spheniscus demersus*) and induction of parasite recrudescence [J]. *Journal of Wildlife Diseases*, 1994, 30(3): 372-376.
- [18] GRACZYK T K, CRANFIELD M R, MCCUTCHAN T F, *et al.* Characteristics of naturally acquired avian malaria infections in naive juvenile African black-footed penguins (*Spheniscus demersus*) [J]. *Parasitology Research*, 1994, 80(8): 634-637.
- [19] GRACZYK T K, CRANFIELD M R, SKJOLDAGER M L, *et al.* An ELISA for detecting anti-*Plasmodium* spp. antibodies in African black-footed penguins (*Spheniscus demersus*) [J]. *The Journal of Parasitology*, 1994, 80(1): 60-66.
- [20] VANSTREELS R E T, KOLESNIKOVAS C K M, SANDRI S, *et al.* Outbreak of avian malaria associated to multiple species of *Plasmodium* in magellanic penguins undergoing rehabilitation in southern Brazil [J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e94994.
- [21] VANSTREELS R E T, DA SILVA-FILHO R P, KOLESNIKOVAS C K M, *et al.* Epidemiology and pathology of avian malaria in penguins undergoing rehabilitation in Brazil [J]. *Veterinary Research*, 2015, 46: 30.
- [22] HELLGREN O, WALDENSTRÖM J, BENSCHE S. A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood [J]. *The Journal of Parasitology*, 2004, 90(4): 797-802.
- [23] BENSCHE S, HELLGREN O, PÉREZ-TRIS J. MalAvi: a public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome *b* lineages [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2009, 9(5): 1353-1358.
- [24] VALKIŪNAS G. Avian malaria parasites and other haemosporidia [M]. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2005: 720-724.
- [25] CHAGAS C R F, DE OLIVEIRA GUIMARÃES L, MONTEIRO E F, *et al.* Hemosporidian parasites of free-living birds in the São Paulo Zoo, Brazil [J]. *Parasitology Research*, 2016, 115(4): 1443-1452.
- [26] LIU B Y, DENG Z Q, HUANG W, *et al.* High prevalence and narrow host range of haemosporidian parasites in Godlewski's bunting (*Emberiza godlewskii*) in northern China [J]. *Parasitology International*, 2019, 69: 121-125.
- [27] BANDA M E, HOWE L, GARTRELL B D, *et al.* A cluster of avian malaria cases in a kiwi management programme [J]. *New Zealand Veterinary Journal*, 2013, 61(3): 121-126.
- [28] ILGŪNAS M, PALINAUSKAS V, PLATONOVA E, *et al.* The experimental study on susceptibility of common European songbirds to *Plasmodium elongatum* (lineage pGRW6), a widespread avian malaria parasite [J]. *Malaria Journal*, 2019, 18(1): 290.
- [29] CASTRO I, HOWE L, TOMPKINS D M, *et al.* Presence and seasonal prevalence of *Plasmodium* spp. in a rare endemic New Zealand passerine (tieke or saddleback, *Philesturnus carunculatus*) [J]. *Journal of Wildlife Diseases*, 2011, 47(4): 860-867.
- [30] ALLEY M R, HALE K A, CASH W, *et al.* Concurrent avian malaria and avipox virus infection in translocated South Island saddlebacks (*Philesturnus carunculatus carunculatus*) [J]. *New Zealand Veterinary Journal*, 2010, 58(4): 218-223.