

文章编号: 1000-7423(2020)-01-0017-06 DOI: 10.12140/j.issn.1000-7423.2020.01.003

【论 著】

# 西藏阿里地区细粒棘球蚴人体分离株 *nad1* 基因多态性分析

魏玉环<sup>1</sup>, 刘华<sup>1</sup>, 李武军<sup>2</sup>, 赵海<sup>3</sup>, 胡媛<sup>1\*</sup>, 曹建平<sup>1</sup>

**【摘要】** 目的 了解西藏阿里地区细粒棘球蚴人体分离株的优势基因型及遗传变异情况, 为细粒棘球蚴的溯源及阿里地区棘球蚴病预防控制策略的制定提供支持。方法 收集阿里地区某医院 2017 年棘球蚴病患者病灶切除样品, 提取 DNA, PCR 扩增线粒体 NADH 脱氢酶 1 (*nad1*) 基因, 扩增产物测序后用 BLAST、ClustalX 1.83 和 MEGA 7.0 软件进行同源性和系统进化分析。下载全国细粒棘球蚴人体分离株的 *nad1* 基因, 利用 DnaSP6 分析单倍型; 利用 NetWork 软件制作中国细粒棘球蚴 *nad1* 基因的单倍型网络图。结果 共收集 80 例细粒棘球蚴病患者病灶切除样品, 其中 38 份样品 PCR 扩增出约 550 bp 的特异性条带。测序分析结果显示, 4 份样品为细粒棘球蚴 G6 基因型, 与蒙古人来源的序列 (MH300971.1) 一致性为 99.8%; 其余 34 份样品均为细粒棘球蚴 G1 基因型, 与标准序列 (AF297617.1) 相比, 其 535 位的 C 碱基突变为 G 碱基, 与阿尔及利亚人来源序列 (MG672293.1) 的一致性为 100%。MEGA 7.0 软件分析 38 份样品的序列, 结果显示, T、C、A 和 G 碱基占比依次为 44.3%~46.5%、7.7%~9.1%、19.8%~21.5% 和 25.7%~26.0%。我国已报道的细粒棘球蚴 *nad1* 基因共有 9 个单倍型, 单倍型多样性为 0.47, 核酸多样性为 0.19。单倍型网络图显示, H4 为我国细粒棘球蚴 *nad1* 基因主要的单倍型。结论 细粒棘球蚴 G1、G6 基因型是西藏阿里地区的主要基因型, 资料分析表明 H4 为我国流行的细粒棘球蚴 *nad1* 基因的主要单倍型。

**【关键词】** 细粒棘球蚴; 基因多态性; *nad1* 基因; 单倍型

中图分类号: R383.33 文献标志码: A

## Analysis of *nad1* gene polymorphisms of *Echinococcus granulosus* isolates from humans in Ali region of Tibet

WEI Yu-huan<sup>1</sup>, LIU Hua<sup>1</sup>, LI Wu-jun<sup>2</sup>, ZHAO Hai<sup>3</sup>, HU Yuan<sup>1\*</sup>, CAO Jian-ping<sup>1</sup>

(1 National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention; Chinese Center for Tropical Diseases Research; WHO Collaborating Centre for Tropical Diseases; National Center for International Research on Tropical Diseases, Ministry of Science and Technology; Key Laboratory of Parasite and Vector Biology, Ministry of Health, Shanghai 200025, China; 2 General Surgery, First Affiliated Hospital of Xi'an Medical College, Xi'an 710077, China; 3 Laboratory Department of Shaanxi People's Hospital, Xi'an 710068, China)

**【 Abstract 】 Objective** To understand the dominant genotypes and genetic variations of *Echinococcus granulosus* isolates from humans in Ali region, in order to provide support for tracing the origin of *E. granulosus* and formulating strategies for prevention and control of echinococcosis in Ali region. **Methods** Specimens resected from hydatidosis patients in 2017 in a hospital in Ali area were used for DNA extraction. Mitochondrial NADH dehydrogenase 1 (*nad1*) gene was amplified by PCR. The PCR products were sequenced and analyzed by BLAST, ClustalX 1.83 and MEGA 7.0 softwares for homology and phylogenetic analyses. The *nad1* gene sequences of *E. granulosus* in China was downloaded and the haplotypes were analyzed by DnaSP6. The haplotype network map of

**基金项目:** 国家科技重大专项 (No. 2018ZX10102001-002-004); 国家自然科学基金 (No. 81772225, No. 81971969); 西藏阿里地区自然科学基金 (No. akkczjj20180202)

**作者单位:** 1 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 国家热带病研究中心, 世界卫生组织热带病合作中心, 科技部国家级热带病国际联合研究中心, 卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室, 上海 200025; 2 西安医学院第一附属医院普通外科, 西安 710077; 3 陕西省人民医院检验科, 西安 710068

**作者简介:** 魏玉环 (1993-) 女, 硕士研究生, 从事寄生虫病防控研究。E-mail: weiyh688@126.com

\* 通讯作者, 胡媛, E-mail: huyuan@nipd.chinacdc.cn

网络出版时间: 2020-01-17 09:30

网络出版路径: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1248.R.20200116.1009.006.html>

*nad1* gene of *E. granulosus* in China was drawn by the NetWork software. **Results** A total of 80 specimens of hydatidosis were collected, and 38 resulted in a specific band around 550 bp after PCR amplification. Sequencing analysis revealed that *E. granulosus* in 4 cases had the G6 genotype, which was 99.81% homogeneous with the sequence of Mongolian origin (MH300971.1). The remaining 34 cases revealed G1 genotype of *E. granulosus*, which had a C-to-G mutation at position 535 as compared to the standard sequence (AF297617.1) and was 100% homogeneous with that of the Algerian origin (MG672293.1). Analysis of the 38 samples with MEGA 7.0 software showed that the bases T, C, A and G constituted 44.3%–46.5%, 7.7%–9.1%, 19.8%–21.5% and 25.7%–26.0%, respectively. The reported *E. granulosus nad1* gene in China had 9 haplotypes, with a haplotype diversity of 0.47 and nucleotide diversity of 0.19. The haplotype network map showed that H4 was the main haplotype for *nad1* gene in China. **Conclusion** G1 and G6 are the genotypes of *E. granulosus nad1* gene in Ali region. The data analysis indicates that H4 is the major haplotype for *E. granulosus nad1* gene in China.

**【Key words】** *Echinococcus granulosus*; Genetic polymorphism; *nad1* gene; Haplotype

Supported by National Science and Technology Major Project (No. 2018ZX10102001-002-004), National Natural Science Foundation of China (No. 81772225, No. 81971969), and Natural Science Foundation of Ali Region, Tibet (No. akkczrjj20180202)

\* Corresponding author, E-mail: huyuan@nipd.chinacdc.cn

细粒棘球蚴病是由细粒棘球绦虫 (*Echinococcus granulosus*) 的幼虫寄生于人和动物中间宿主而引起的人兽共患寄生虫病, 对人类健康和畜牧业生产造成严重危害<sup>[1]</sup>。世界卫生组织把棘球蚴病列为一种重要的被忽视热带病<sup>[2]</sup>, 联合国粮食及农业组织将其归为食源性疾病<sup>[3]</sup>。目前细粒棘球绦虫分为 G1~G10 和狮株, 目前认为 G2 和 G9 不是有效的基因型, G9 是 G7 的变异体, G2 和 G3 同属于 G3 基因型, 所以共 9 个基因型<sup>[4-8]</sup>。分析细粒棘球蚴人体分离株基因型, 对于棘球蚴病溯源、防治和控制均有重要意义。PCR-限制性片段长度多态性<sup>[9]</sup>、随机扩增多态性 DNA<sup>[10]</sup>、单链构象多态性<sup>[11]</sup>和微卫星 DNA 等<sup>[12]</sup>是分析基因多态性的常用技术。近年来因为结构简单、非同源重组、进化速度快、母系方式遗传和可做单倍型分析等优点, 线粒体 DNA (mtDNA) 为细粒棘球绦虫多态性分析提供了有效的基因标志<sup>[13]</sup>。其中线粒体 NADH 脱氢酶 1 (NADH dehydrogenase 1, *nad1*) 基因进化速度较快, 在种群间甚至种群内即可产生较大的差异<sup>[14]</sup>, 常被用作分析细粒棘球绦虫基因多态性的标志。

西藏自治区 (简称西藏) 是我国棘球蚴病的高度流行区。2016 年国家组织了 17 个省 (自治区、直辖市) 援助其开展棘球蚴病流行病学调查, 结果发现西藏的 74 个县均为流行县, 占全国流行县的 1/5, 现症患者数占全国的 30%<sup>[15]</sup>。阿里地区位于青藏高原西南部, 平均海拔 4 500 m 以上, 高寒缺氧, 昼夜温差大, 地广人稀。藏族人口占 90% 以上, 居民以放牧为主, 棘球蚴病防治基础薄弱, 流行状况调查起步较晚<sup>[16]</sup>。阿里地区家畜和人感染的

风险在西藏是最高的<sup>[17]</sup>。目前尚未见该地区有关棘球蚴基因多态性的研究报道。

本研究基于 *nad1* 基因, 探究西藏阿里地区细粒棘球蚴人体分离株的基因型, 对 *nad1* 基因的核苷酸和单倍型多样性进行分析, 阐明该地区细粒棘球绦虫在人群流行的优势株及其遗传变异特性, 为该地区细粒棘球蚴病的预防控制提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 细粒棘球蚴分离株

与阿里地区某医院合作, 收集该院 2017 年棘球蚴患者病灶切除样品和患者基本信息。样品用石蜡包埋技术保存。

### 1.2 主要试剂

基因组提取试剂盒 (型号: EE191-01) 购自北京全是金生物公司, PCR 反应试剂购自日本 TaKaRa 公司, 核酸染料购自北京鼎国昌盛生物科技有限公司, DNA 标志物购自北京天根生化科技有限公司。

### 1.3 基因组 DNA 的提取

刀片刮取 3~10 张石蜡切片 (5~10  $\mu\text{m}$  厚) 置于 1.5 ml 离心管中, 在通风橱中操作, 加入 1 ml 的二甲苯, 剧烈涡旋 10 s, 12 000  $\times g$  离心 2 min, 弃上清。按照基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取细粒棘球蚴基因组 DNA, -20  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.4 线粒体 *nad1* 基因的 PCR 扩增

参照文献 [18] 的方法合成 *nad1* 基因的引物, 上游引物 F 为 5'-AGATTCGTAAGGGCCTAATA-3', 下游引物 R 为 5'-ACCACTAATAATTCACCTTTC-3'。

引物由上海赛因生物科技有限公司合成。PCR 反应体系 (50  $\mu$ l): 上、下游引物各 1.0  $\mu$ l (10  $\mu$ mol/L), Ex Taq DNA 聚合酶 25  $\mu$ l, 模板 DNA 1.0  $\mu$ l, 蒸馏水 22  $\mu$ l, 混合均匀后瞬时离心。同时, 以感染羊包囊组织提取的 DNA 为阳性对照, 以蒸馏水作为空白对照。PCR 反应条件为: 95  $^{\circ}$ C 5 min; 95  $^{\circ}$ C 15 s, 55  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 45 s, 共 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.5 PCR 扩增产物的序列测定及多态性分析

将 PCR 扩增产物送上海赛因生物科技有限公司进行双向测序, 序列经拼接后在 NCBI 网站 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行 BLAST 比对。从 NCBI 数据库下载各基因型的标准序列: AF297617.1 (*E. granulosus* G1)<sup>[19]</sup>、MG682544.1 (*E. granulosus* G3)<sup>[20]</sup>、AB786665.1 (*E. equinus* G4)<sup>[21]</sup>、AB235846.1 (*E. ortleppi* G5)<sup>[4]</sup>、AB208063.1 (*E. canadensis* G6)<sup>[21]</sup>、AB235847.1 (*E. canadensis* G7)<sup>[4]</sup>、AB235848.1 (*E. canadensis* G8)<sup>[4]</sup>、AB745463.1 (*E. canadensis* G10)<sup>[19]</sup>、AB732958.1 (*E. felidis*)<sup>[21]</sup>、AB208064.1 (*E. shiquicus*)<sup>[4]</sup>、AB018440.2 (*E. multilocularis*)<sup>[22]</sup>、MG672293.1 (*E. granulosus* G1)<sup>[22]</sup>、MH300971.1 (*E. granulosus* G6)<sup>[23]</sup>。PCR 产物测序后用 ClustalX 1.83 软件进行序列比对和剪接, 利用 MEGA 7.0 软件, 采用邻接法 (neighbor-joining) 构建系统进化树, 选择 Kimura 2-parameter 模式, 进行重复 1 000 次的自举检验。

### 1.6 中国细粒棘球蚴 *nad1* 基因的单倍型网络图

在 NCBI 数据库下载目前中国所有上传的 *nad1* 基因序列: KJ556995.1-KJ556993.1、KJ663949.1、MH050630.1-MH050620.1。利用 DnaSP6 分析中国细粒棘球蚴 *nad1* 基因的单倍型、单倍型多样性和核酸多样性。利用 NetWork 软件制作中国的棘球蚴单倍型网络图。

### 1.7 伦理批准和患者知情同意

本研究获得中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所伦理审查会批准 (伦理批准号: IPD No. 2019-002)。细粒棘球蚴病理组织样品和患者基本信息的采集均取得患者或家属的知情同意。

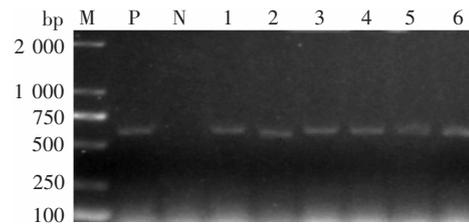
## 2 结果

### 2.1 *nad1* 基因的 PCR 扩增

在阿里地区共收集 80 例棘球蚴病患者病灶切除样品, 其中 38 份扩增出约 550 bp 片段, 与预期大小一致 (图 1)。

### 2.2 测序及基因型分析

序列比对分析结果表明, 38 份细样品中 34 份为细粒棘球蚴 G1 基因型, 与阿尔及利亚人来源的序列 (MG672293.1) 一致性为 100%, 4 份为 G6 基



M: DNA 标志物; 1~6: 细粒棘球蚴人体分离株; P: 阳性对照; N: 阴性对照

M: DNA marker; 1-6: Samples of *E. granulosus* isolates from patients; P: Positive control; N: Negative control

图1 阿里地区细粒棘球蚴人体分离株 *nad1* 基因扩增结果

Fig. 1 PCR products for *nad1* amplified from *E. granulosus* isolates from patients in Ali area

因型, 与蒙古人来源的序列 (MH300971.1) 一致性为 99.8%。与标准序列 (AF297617.1) 对比, G1 基因型样品的 *nad1* 序列在 535 位的碱基由 C 突变为 G。MEGA 7.0 软件分析发现, 38 份样品的 T、C、A 和 G 碱基占比依次为 44.3%~46.5%、7.7%~9.1%、19.8%~21.5% 和 25.7%~26.0%。

### 2.3 细粒棘球蚴人体分离株系统发生树

基于 *nad1* 基因序列, 细粒棘球蚴分离株系统进化树结果显示, 阿里地区的分离株 *nad1*-38 与 G6 基因型在一个分支上, G6、G7、G8 与 G10 基因型都属于细粒棘球蚴加拿大株。*nad1*-4 与 G1、G3 基因型在同一个分支上, 都属于细粒棘球蚴狭义株 (图 2)。

### 2.4 我国细粒棘球蚴人体分离株单倍型网络图

基于 *nad1* 基因序列, 我国单倍型网络图显示, 已报道的我国细粒棘球蚴共有 9 个单倍型, 单倍型多样性为 0.47, 核酸多样性为 0.19。单倍型网络图显示 H4 为我国 *nad1* 基因主要的单倍型, 在西藏、内蒙古和四川均有分布 (图 3)。

## 3 讨论

棘球蚴病是世界上严重的公共卫生问题, 不仅影响人体健康还造成巨大的经济损失。Fasihi 等<sup>[24]</sup>报道棘球蚴病患者疾病负担为 100.97 亿伤残调整寿命年 (DALYs), 其中中国的细粒棘球蚴病疾病负担高达 39.8 万 DALYs, 居全球前列。全国每年感染棘球蚴的家畜 5 000 万头, 造成的经济损失近 30 亿元<sup>[25]</sup>。西藏自治区犬粪棘球蚴抗原阳性率, 牛、羊感染率和人群感染率均较高<sup>[26-27]</sup>。阿里地区海拔高, 地广人稀, 样品采集困难, 尚未见该地基因多态性的报道。

本研究对阿里地区棘球蚴人体分离株样品采用 PCR 方法扩增 *nad1* 基因, 并对 PCR 产物进行测序分析。有 38 份患者样品扩增出约 550 bp 的特异性条带, 其中 4 份为细粒棘球蚴 G6 基因型, 其余

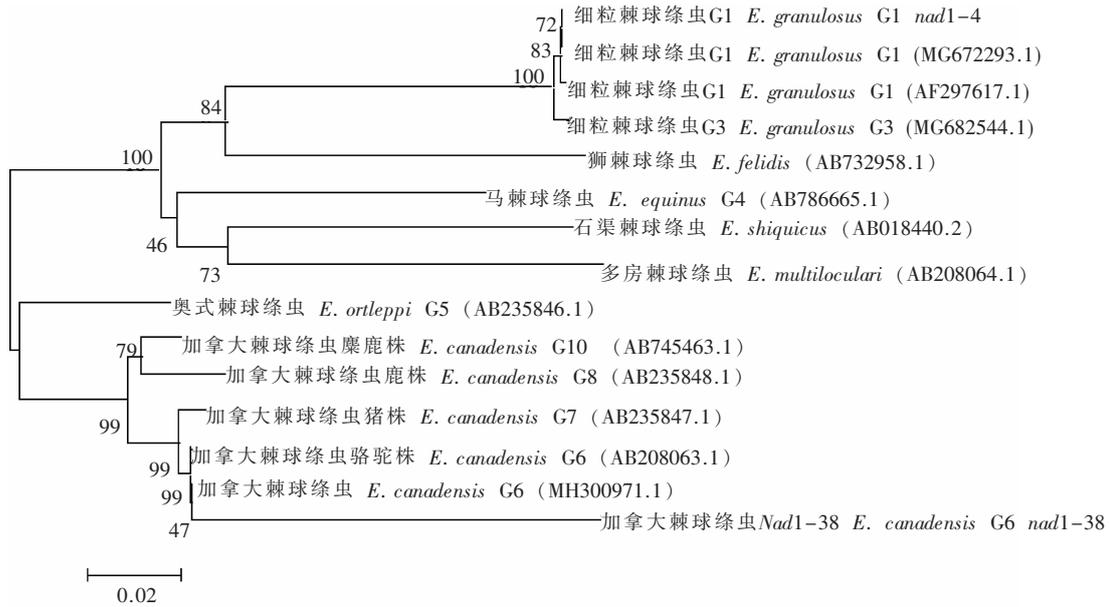


图2 基于线粒体nad1基因序列以邻接法构建的阿里地区细粒棘球绦虫人体分离株系统进化树  
 Fig. 2 Phylogenetic tree of *E. granulosus* isolates in Ali region constructed by the neighbor-joining method based on mitochondrial *nad1*

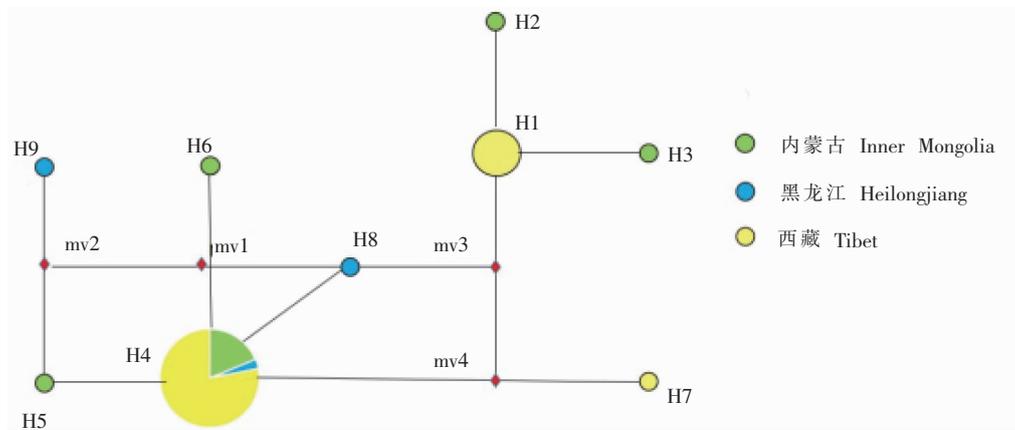


图3 基于线粒体nad1基因序列构建的中国细粒棘球绦虫单倍型网络图  
 Fig. 3 Haplotypes network of *E. granulosus* isolates in China based on mitochondria *nad1* sequences

34 份均为细粒棘球绦虫 G1 基因型。这些基因型在国内均有报道<sup>[28]</sup>。阿里地区生产类型主要是牧业和半农半牧业，细粒棘球绦虫 G1 基因型是阿里地区主要的基因型，其适宜中间宿主羊是该地区的主要经济来源。有文献报道 *nad1* 变异率较高，本研究 34 份 G1 基因型的 *nad1* 序列与标准序列 (AF297617.1) 对比，仅在 535 位有一个碱基突变，与张学勇等<sup>[29]</sup>报道的不相符，可能与不是全长测序有关。38 份细粒棘球绦虫分离株的 DNA 序列里碱基 A+T 总量约为 70%，碱基分布存在偏性，与延宁等<sup>[18]</sup>报道相似。

基于 *nad1* 序列以邻接法构建的系统进化树结构与 Yang 等<sup>[30]</sup>报道的相似，G6、G7、G8 与 G10 基因型聚集在细粒棘球绦虫加拿大株，G1、G3 基因

型聚集在细粒棘球绦虫狭义株。在我国终末宿主 (犬和狼) 体内，已发现细粒棘球绦虫 G1、G3 和 G6 基因型；在中间宿主山羊和绵羊体内发现细粒棘球绦虫 G1、G6 和 G8 基因型；在牛和骆驼体内发现细粒棘球绦虫 G1、G3 和 G6 基因型；人体感染的细粒棘球绦虫主要是 G1、G3、G6、G7 和 G10 基因型<sup>[28, 31-32]</sup>。阿里地区动物资源丰富，除了牧民养殖的牛、羊、犬外，还有野牛、野驴和黄羊等偶蹄类动物，为细粒棘球绦虫多种基因型等的存在创造了条件。但本研究只发现了细粒棘球绦虫的 G1 和 G6 基因型，除了与不同的基因型感染宿主的能力有关，可能也与该研究的样本量较少有关。单倍型多样性和核苷酸多样性常用来衡量种群间和种群内的多样性，本研究基于全国细粒棘球绦虫人体分离株

共 44 条 *nad1* 序列的分析, 发现了 9 个单倍型, 单倍型多样性为 0.47, 核酸多样性为 0.19, 大于 0.01, 说明全国范围细粒棘球蚴的遗传变异较大。单倍型网络图显示 H4 为我国 *nad1* 基因主要的单倍型, 在西藏、内蒙古和黑龙江等省(自治区)均有分布。说明该单倍型分布广泛, 在基因多态性相关的研究中要予以重视。

本研究对阿里地区细粒棘球蚴人体分离株的基因型和基因遗传多态性进行分析, 发现阿里地区人群中流行的细粒棘球蚴基因型主要是 G1、G6 型, H4 为中国细粒棘球蚴 *nad1* 基因主要的单倍型, 为细粒棘球蚴的溯源及阿里地区棘球蚴病防控提供支持。

**出版授权** 作者同意以纸版和网络版的形式同时出版。

**数据和材料的可及性** 本研究中文献材料与数据, 如果需要请与胡媛联系。

**利益冲突** 作者声明无利益冲突。

**作者贡献** 魏玉环撰写论文和开展实验研究, 刘华协助开展实验研究, 李武军与赵海负责样品采集, 胡媛与曹建平负责论文设计、审校和协调。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] He Y, Yin JX. Analysis for epidemiological factors of echinococcosis [J]. *China Trop Med*, 2017, 17(4): 418-420. (in Chinese)  
(何叶, 尹家祥. 棘球蚴病流行因素分析[J]. *中国热带医学*, 2017, 17(4): 418-420.)
- [ 2 ] Holmes P. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases[R]. Geneva: WHO, 2015, 7(4244): 596-596.
- [ 3 ] Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. Multicriteria-based ranking for risk management of food borne parasites [R]. Rome: FAO Headquarters, 2012.
- [ 4 ] Kinkar L, Laurimäe T, Balkaya I, et al. Genetic diversity and phylogeography of the elusive, but epidemiologically important *Echinococcus granulosus* sensu stricto genotype G3[J]. *Parasitology*, 2018, 145(12): 1613-1622.
- [ 5 ] Laurimäe T, Kinkar L, Romig T, et al. The benefits of analysing complete mitochondrial genomes: deep insights into the phylogeny and population structure of *Echinococcus granulosus* sensu lato genotypes G6 and G7[J]. *Infect Genet Evol*, 2018, 64: 85-94.
- [ 6 ] Maldonado LL, Assis J, Araújo FM, et al. The *Echinococcus canadensis* (G7) genome: a key knowledge of parasitic platyhelminth human diseases [J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 204.
- [ 7 ] Lymbery AJ. Phylogenetic pattern, evolutionary processes and species delimitation in the genus *Echinococcus* [J]. *Adv Parasitol*, 2017, 95: 111-145.
- [ 8 ] Sharma M, Fomda BA, Mazta S, et al. Genetic diversity and population genetic structure analysis of *Echinococcus granulosus* sensu stricto complex based on mitochondrial DNA signature [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e82904.
- [ 9 ] Kim HJ, Yong TS, Shin MH, et al. Practical algorithms for PCR-RFLP-based genotyping of *Echinococcus granulosus* sensu lato [J]. *Korean J Parasitol*, 2017, 55(6): 679-684.
- [ 10 ] Taha HA. Genetic variations among *Echinococcus granulosus* isolates in Egypt using RAPD-PCR[J]. *Parasitol Res*, 2012, 111(5): 1993-2000.
- [ 11 ] Alvarez Rojas CA, Romig T, Lightowers MW. *Echinococcus granulosus* sensu lato genotypes infecting humans-review of current knowledge[J]. *Int J Parasitol*, 2014, 44(1): 9-18.
- [ 12 ] Maillard S, Gottstein B, Haag KL, et al. The EmsB tandemly repeated multilocus microsatellite: a new tool to investigate genetic diversity of *Echinococcus granulosus* sensu lato[J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(11): 3608-3616.
- [ 13 ] Casulli A, Interisano M, Sreter T, et al. Genetic variability of *Echinococcus granulosus* sensu stricto in Europe inferred by mitochondrial DNA sequences[J]. *Infect Genet Evol*, 2012, 12(2): 377-383.
- [ 14 ] Zhu WJ. Studies on the molecular phylogeny of two types *Echinococcus* in the Qinghai Province[D]. Xining: Qinghai University, 2018. (in Chinese)  
(朱文君. 青海省两型棘球属绦虫分子种系发生的研究 [D]. 西宁: 青海大学, 2018.)
- [ 15 ] Wu WP, Wang H, Wang Q, et al. A nationwide sampling survey on echinococcosis in China during 2012-2016 [J]. *Chin J Parasitol Parasit Dis*, 2018, 36(1): 1-14. (in Chinese)  
(伍卫平, 王虎, 王谦, 等. 2012-2016 年中国棘球蚴病抽样调查分析[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2018, 36(1): 1-14.)
- [ 16 ] Suolang WJ, Wu WP, Danzhen WJ, et al. Epidemiological survey on hydatid disease in livestock in Tibet Autonomous Region[J]. *Chin J Parasitol Parasit Dis*, 2018, 36(1): 30-34. (in Chinese)  
(索郎旺杰, 伍卫平, 旦珍旺久, 等. 西藏自治区家畜棘球蚴感染情况调查[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2018, 36(1): 30-34.)
- [ 17 ] Xiao D, Wu WP, Xue L, et al. Prevalence of hydatid disease in Ali Prefecture[J]. *Chin J Parasitol Parasit Dis*, 2018, 36(1): 54-57. (in Chinese)  
(肖丹, 伍卫平, 雪莲, 等. 阿里地区棘球蚴病流行现状[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2018, 36(1): 54-57.)
- [ 18 ] Sharbathkhor M, Tanzifi A, Rostami S, et al. *Echinococcus granulosus* sensu lato genotypes in domestic livestock and humans in golesan province, Iran [J]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 2016, 58: 38.
- [ 19 ] Le TH, Pearson MS, Blair D, et al. Complete mitochondrial genomes confirm the distinctiveness of the horse-dog and sheep-dog strains of *Echinococcus granulosus* [J]. *Parasitology*, 2002, 124(Pt 1): 97-112.
- [ 20 ] Pestechian N, Hosseini Safa A, Tajedini M, et al. Genetic diversity of *Echinococcus granulosus* in center of Iran [J]. *Korean J Parasitol*, 2014, 52(4): 413-418.
- [ 21 ] Nakao M, Yanagida T, Konyaev S, et al. Mitochondrial phylogeny of the genus *Echinococcus* (Cestoda : Taeniidae) with emphasis on relationships among *Echinococcus canadensis* genotypes[J]. *Parasitology*, 2013, 140(13): 1625-1636.
- [ 22 ] Kinkar L, Laurimäe T, Acosta-Jamett G, et al. Global phylogeography and genetic diversity of the zoonotic tapeworm *Echinococcus granulosus* sensu stricto genotype G1 [J]. *Int J Parasitol*, 2018, 48(9/10): 729-742.
- [ 23 ] Laurimäe T, Kinkar L, Romig T, et al. The benefits of analysing complete mitochondrial genomes: deep insights into the phylogeny and population structure of *Echinococcus granulosus* sensu lato genotypes G6 and G7 [J]. *Infect Genet Evol*, 2018, 64: 85-94.