

Protective Effect of the *Nramp1* BB Genotype against *Brucella abortus* in the Water Buffalo (*Bubalus bubalis*)

Rosanna Capparelli,¹ Flora Alfano,² Maria Grazia Amoroso,³ Giorgia Borriello,³ Domenico Fenizia,² Antonio Bianco,⁴ Sante Roperto,⁵ Franco Roperto,⁵ and Domenico Iannelli^{3*}

Faculty of Biotechnological Sciences, University of Naples Federico II, Naples, Italy¹; Istituto Zooprofilattico Sperimentale per il Mezzogiorno, Portici, Italy²; Chair of Immunology, Faculty of Agriculture, University of Naples Federico II, Naples, Italy³; Regione Campania, Assessorato all'Agricoltura, Naples, Italy⁴; and Faculty of Veterinary Medicine, University of Naples Federico II, Naples, Italy⁵

Received 14 June 2006/Returned for modification 9 August 2006/Accepted 20 November 2006

We tested 413 water buffalo cows (142 cases and 271 controls) for the presence of anti-*Brucella abortus* antibodies (by the skin test, the agglutination test, and the complement fixation test) and the *Nramp1* genotype (by capillary electrophoresis). Four alleles (*Nramp1A*, *-B*, *-C*, and *-D*) were detected in the 3' untranslated region of the *Nramp1* gene. The BB genotype was represented among only controls, providing evidence that this genotype confers resistance to *Brucella abortus*. The monocytes from the BB (resistant) subjects displayed a higher basal level of *Nramp1* mRNA and a lower number of viable intracellular bacteria than did the monocytes from AA (susceptible) subjects. The higher basal level of the antibacterial protein *Nramp1* most probably provides the BB animals with the possibility of controlling bacteria immediately after their entry inside the cell.

Abbiamo esaminato 413 bufale d'acqua (142 casi e 271 controlli) per verificare la presenza degli anticorpi anti-*Brucella abortus* (mediante le prove di skin test, di agglutinazione e di fissazione di complemento) e per la ricerca sul genotipo *Nramp1* (tramite elettroforesi capillare). Quattro alleli (*Nramp1A*, *-B*, *-C* e *-D*) sono stati rilevati nella regione non tradotta 3' del gene *Nramp1*. Il genotipo di BB è stato rappresentato soltanto fra i controlli, fornendo la prova che questo genotipo conferisce resistenza all'aborto della brucella. I monocytes dai soggetti (resistenti) di BB hanno visualizzato un livello elevato basale di mRNA *Nramp1* e un numero più basso di batteri intracellulari possibili dei monocytes dagli soggetti (suscettibili) di AA. Il livello elevato basale della proteina antibatterica *Nramp1* il più probabilmente fornisce agli animali di BB la possibilità di controllo dei batteri subito dopo della loro entrata all'interno della cellula.

The mouse gene *Nramp1* (natural resistance-associated macrophage protein 1), also known as *Slc11a1* (solute carrier family 11 member a1), determines the resistance or susceptibility of the host to the intracellular pathogens *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, and *Leishmania donovani* (19). The bovine homolog of the mouse *Nramp1* gene determines the resistance or susceptibility of cattle to *Brucella abortus*, also an intracellular pathogen (5). The transfection of the resistance-associated murine or bovine *Nramp1* allele into the susceptible RAW 264.7 macrophage cell line inhibits the intracellular replication of serovar Typhimurium (19) or *B. abortus* (5), respectively.

These results assign a critical role to the *Nramp1* gene in the innate defense against intracellular infections. The product of *Nramp1* functions as a transporter of Fe²⁺ and other divalent cations. The direction of transport of the cations remains however controversial: it is not clear whether the *Nramp1* protein elevates the concentration of Fe²⁺ in the phagosome to favour the production of the antibacterial hydroxyl radical or, on the contrary, deprives the intraphagosomal bacterium of Fe²⁺ needed by the invading pathogen to survive within the phagosome (2). The *Nramp1* gene is conserved in mammals, plants, insects, worms, and bacteria (11). Its presence in bacteria suggests that the intracellular pathogen and host may compete for the same nutrient (21).

Recently, to investigate the possible role of the *Nramp1* gene in the resistance of water buffaloes to *B. abortus* infection, the 3' untranslated region (UTR) of the gene was analyzed for polymorphism by denaturing gradient gel electrophoresis. Homozygosity for the *Nramp1B* allele was found to be associated with resistance to *B. abortus* infection (7). Given the concern for the false-positive results characterizing association studies in general (4, 9, 28), a replication of the original report seemed crucial.

The present study, carried out on a larger and independent group of animals and using an independent technique (capillary electrophoresis), confirms the initial data. The study also provides biological support for the association between *Nramp1* gene activity and resistance to the disease. The interest of the study goes beyond water buffalo brucellosis. The ubiquitous *Nramp1* gene can be used to select goats and sheep resistant to *B. melitensis*, the agent responsible for most cases of human brucellosis (14).

Il gene *Nramp1* (proteina resistenza-collegata naturale 1 del mouse del macrofago), anche conosciuto come *Slc11a1* (membro al della famiglia 11 dell'elemento portante del soluto), determina la resistenza o la predisposizione dell'ospite ai batteri patogeni intracellulari *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin, *Salmonella enterica* sierotipo Typhimurium, and *Leishmania donovani* (19). L'omologo del bovino del gene del mouse *Nramp1* determina la resistenza o la predisposizione dei bestiami all'aborto brucellare, che è determinato anche da un agente patogeno intracellulare (5). Il trasferimento dell'allele resistenza-collegato del bovino o murino *Nramp1* nella varietà di cellula GREZZA suscettibile dei 264.7 macrofagi inibisce la replica intracellulare dell'ella *Brucella abortus* (19) e del sierotipo *S. Typhimurium* (5), rispettivamente. Questi risultati assegnano un ruolo critico al gene *Nramp1* nella difesa innata contro le infezioni intracellulari. Il prodotto di *Nramp1* funziona come trasportatore di Fe^{2+} e di altri cationi bivalenti. Il senso di trasporto dei cationi rimane tuttavia discutibile: non è chiaro se la proteina *Nramp1* eleva la concentrazione di Fe^{2+} nel fagosoma per favorire la produzione dell'idrossile antibatterico radicale o, al contrario, priva il batterio intraphagosomiale di Fe^{2+} stato necessario dall'agente patogeno d'invasione per sopravvivere all'interno del fagosoma (2). Il gene *Nramp1* si conserva in mammiferi, in piante, in insetti, in viti senza fine ed in batteri (11). La relativa presenza in batteri suggerisce che l'agente patogeno e l'ospite intracellulari possono competere per la stessa sostanza nutriente (21). Recentemente, è stato studiato il ruolo possibile del gene *Nramp1* nella resistenza dei bufali dell'acqua all'infezione della *Brucella abortus*, the 3' untranslated region (UTR) of the gene è stata analizzata per la verifica del suo polimorfismo mediante denaturazione e trasporto elettroforetico. Gli alleli omozigoti del gene *Nramp1B* sono stati verificati come associati alla resistenza all'infezione da *B. abortus* (7). Dato la preoccupazione per i risultati falso-positivi che caratterizzano l'associazione studia generalmente (4, 9, 28), una replica del rapporto originale ha sembrato cruciale. Il presente studio, effettuato su un più grande e gruppo indipendente degli animali e di usando una tecnica indipendente (elettroforesi capillare), conferma i dati iniziali. Lo studio inoltre fornisce il supporto biologico per l'associazione fra attività del gene *Nramp1* e resistenza alla malattia. L'interesse dello studio va oltre brucellosi del bufalo dell'acqua. Il gene ubiquitario *Nramp1* può essere usato per selezionare le capre e le pecore resistenti alla *B. melitensis*, l'agente responsabile della maggior parte dei casi di brucellosi umana (14).

MATERIALS AND METHODS

Study design. Allele segregation (at the *Nramp1* locus and eight microsatellite marker loci) was studied on 166 water buffalo triads (father, mother, and offspring).

The animals forming the triads were not included in the association study as they belonged to an experimental herd free from brucellosis. Cases were subjects positive for brucellosis by the skin test, the agglutination test, and the complement fixation test. Controls were animals negative by the same tests.

Cases and controls (142 and 271 subjects, respectively) were randomly drawn from a list of about 1,000 lactating cows distributed in three herds located in the province of Caserta (Italy). Cows were all unvaccinated and ear tagged. Herds were characterized by a high incidence of brucellosis (up to 40% of the subjects were positive by the agglutination and complement fixation tests). Cases and controls were therefore homogeneous in terms of environmental exposure and sex. Genotype analysis was carried out without knowing the results of the brucellosis tests. To avoid stratification (33), cases of brucellosis and controls were drawn in equal proportion (47 cases and 90 controls) from each herd.

Identification of *Nramp1* alleles. Capillary electrophoresis was carried out using the PE-Applied Biosystems ABI PRISM 310 analyzer equipped with a 47-cm-long and 50- μ m-wide capillary. The separation medium was the POP-4 polymer. The 3' untranslated region, nucleotide positions 1745 to 1955, of the water buffalo *Nramp1* gene was amplified using the forward primer 5'-GTGGA ATGAGTGGGCACAGT-3' and the reverse primer 5'-CTCTCCGTCTTGCT GTGCAT-3' (24). The forward primer was labeled with the fluorescent dye 6-carboxyfluorescein. PCR was carried out in 25 μ l containing 1 μ l GeneAmp PCR Gold buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM deoxynucleoside triphosphate, 0.4 μ M of each primer, 1 U of AmpliTaq Gold DNA polymerase, and 5 μ l of DNA solution (0.5 to 2 ng/ μ l). PCRs were run with the following program: an initial step of 10 min at 95°C, followed by 35 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 55°C, 30 s at 72°C, and a final extension step of 7 min at 72°C. The PCR product (1 μ l) was added to 11.5 μ l of deionized formamide (Applied Biosystems, Foster City, CA) and 0.5 μ l of GeneScan 6-carboxy-X-rhodamine 500 size standard. The samples were incubated at 94°C for 3 min, cooled at 4°C, and then loaded on the ABI PRISM 310. Electrophoresis data were acquired with the ABI PRISM 310 collection

software (Applied Biosystems). The size of alleles was determined using 310 GeneScan 3.1.2 and Genotyper 2.5.2 software (Applied Biosystems).

MATERIALI E METODI Disegno di studio. La segregazione dell'allele (al luogo *Nramp1* e ad otto luoghi dell'indicatore del microsatellite) è stata studiata su 166 triadi del bufalo dell'acqua (padre, madre e prole). Gli animali che formano le triadi non sono stati inclusi nello studio di associazione mentre sono appartenuti ad un gregge sperimentale esente da brucellosi. I casi erano soggetti positivi per brucellosi dalla prova della pelle, dalla prova di agglutinazione e dalla prova di fissazione di complemento. I controlli erano animali negativi dalle stesse prove. Le casi ed i controlli (142 e 271 soggetto, rispettivamente) sono stati individuati a caso da una lista di circa 1.000 bufale lattanti distribuite in tre greggi situate nella provincia di Caserta (Italia). Le mucche erano tutte unvaccinate e l'orecchio etichettato. Le greggi sono state caratterizzate da un'alta incidenza di brucellosi (fino a 40% degli oggetti erano positivi dall'agglutinazione e dalle prove di fissazione di complemento). Casi e i controlli erano quindi omogenei in termini di esposizione alle malattie e sesso. L'analisi di genotipo è stata effettuata senza conoscere i risultati delle prove di brucellosi. Per evitare la stratificazione (33), i casi di brucellosi ed i controlli sono stati disegnati nella proporzione uguale (47 casi e 90 comandi) da ogni gregge. Identificazione degli alleli *Nramp1*. L'elettroforesi capillare è stata effettuata usando l'analizzatore Pe-Applicato del PRISMA 310 di biosistemi ABI dotato dei 47 centimetro-lunghi e del vaso capillare 50- μ m-wide. Il mezzo di separazione era il polimero POP-4. 3 μ l la regione non tradotta, nucleotide posizione 1745 - 1955, del gene del bufalo *Nramp1* dell'acqua è stato amplificato per mezzo dell'iniettore di andata 5'-GTGGA ATGAGTGGGCACAGT-3' e dell'iniettore d'inversione 5'-CTCTCCGTCTTGCT GTGCAT-3' (24). L'iniettore di andata è stato identificato con il carboxyfluorescein fluorescente della tintura 6. PCR è stato effettuato nel μ l 25 che contiene 1 μ l amplificatore dell'oro di GeneAmp PCR, 1.5 millimetri di MgCl₂, 0.2 millimetri di trifosfato di deoxynucleoside, 0.4 M di ogni iniettore, 1 U della polimerasi del DNA dell'oro di AmpliTaq e il μ l 5 di ng/ μ l della soluzione del DNA (0.5 - 2). PCRs è stato fatto funzionare con il seguente programma: un passo iniziale di 10 minuti a 95°C, seguito da 35 cicli di 30 s a 94°C, di 30 s a 55°C, di 30 s a 72°C e di un punto finale di estensione di 7 minuti a 72°C. Il prodotto di PCR (1 μ l) è stato aggiunto a μ l 11.5 di formammide deionizzata (biosistemi applicati, della città adottiva, CA) e a 0.5 μ l del campione di formato della carboxy-X-rodamina 500 di GeneScan 6. I campioni sono stati incubati a 94°C per 3 minuti, si sono raffreddati a 4°C ed allora hanno caricato sul PRISMA 310 di ABI. I dati di elettroforesi sono stati acquistati con il software dell'accumulazione del PRISMA 310 di ABI (biosistemi applicati). Il formato degli alleli è stato determinato usando 310 GeneScan 3.1.2 ed il software di Genotyper 2.5.2 (biosistemi applicati).

Determination of *Nramp1* alleles nucleotide sequence. PCR products from three subjects homozygous for the identified alleles, *Nramp1A*, *-B*, *-C*, and *-D*, were sequenced in both directions. The nucleotide sequence was determined using version 2.0 of the Big Dye terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) and the ABI 310 PRISM genetic analyzer (Applied Biosystems). The length of the capillary was 47 cm, and the section was 50 μ m. The separation medium was the POP-6 polymer (Applied Biosystems). The sequence data were analyzed using GeneScan 3.1.2 and Sequencing Analysis 3.4.1 software (Applied Biosystems).

Detection of microsatellite markers. DNA from the 413 subjects included in the association study were analyzed using eight microsatellite markers. Markers were amplified by using the primer pairs listed below and the following PCR program: an initial step of 10 min at 95°C, followed by 30 cycles of 15 s at 95°C, 1 min at 57°C, 1 min at 72°C, and a final extension step of 10 min at 72°C. PCR products were separated by capillary electrophoresis on ABI PRISM 310 analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Results were analyzed with the GeneScan 3.1.2 and Genotyper 2.5.2 programs (Applied Biosystems). The primers used to amplify the microsatellite markers were forward primer 5'-TTG TCA GCA ACT TCT TGT ATC TTT-3' and reverse primer 5'-TGT TTT AAG CCA CCC AAT TAT TTG-3' (CSSM19); forward primer 5'-GGG AAG GTC CTA ACT ATG GTT GAG-3' and reverse primer 5'-ACC CTC ACT TCT AAC TGC ATT GGA-3' (CSSM42); forward primer 5'-TCT CTG TCT CTA TCA CTA TAT GGC-3' and reverse primer 5'-CTG GGC ACC TGA AAC TAT CAT CAT-3' (CSSM47); forward primer 5'-GGA GGG TTA CAG TCC ATG AGT TTG-3' and reverse primer 5'-TCG CGA TCC AAC TCC TCC TGA AG-3' (CYP21); forward primer 5'-TAC TCG TAG GGC AGG CTG CCT G-

3_ and reverse primer 5_-GAG ACC TCA GGG TTG GTG ATC AG-3_ (D5S2); forward primer 5_-AGG AAT ATC TGT ATC AAC CTC AGT C-3_ and reverse primer 5_-CTG AGC TGG GGT GGG AGC TAT AAA TA-3_ (INRA006); forward primer 5_-AAA GGC CAG AGT ATG CAA TTA GGA G-3_ and reverse primer 5_-CCA CTC CTC CTG AGA ATA TAA CAT G-3_ (MAF65); and forward primer 5_-CAG CAA AAT ATC AGC AAA CCT-3_ and reverse primer 5_-CCA CCT GGG AAG GCC TTT A-3_ (RM4).

Determinazione della sequenza del nucleotide degli alleli Nrampl. Prodotti di PCR da tre oggetti homozygous per gli alleli identificati, NramplA, - B, - C e - la D, è stata ordinata in entrambi i sensi. La sequenza del nucleotide è stata determinata usando la versione 2.0 del corredo grande ordinare di ciclo del terminale della tintura (biosistemi applicati, della città adottiva, CA) e dell'analizzatore genetico del PRISMA di ABI 310 (biosistemi applicati). La lunghezza del vaso capillare era di 47 centimetri e la sezione era μ 50. Il mezzo di separazione era POP-6 il polimero (biosistemi applicati). I dati di sequenza sono stati analizzati usando GeneScan 3.1.2 ed ordinando il software in serie di analisi 3.4.1 (biosistemi applicati). Rilevazione degli indicatori del microsatellite. Il DNA dai 413 oggetti inclusi nello studio di associazione è stato analizzato usando otto indicatori del microsatellite. Gli indicatori sono stati amplificati usando gli accoppiamenti più supereleganti elencati qui sotto ed il seguente programma di PCR: un passo iniziale di 10 minuti a 95°C, seguito da 30 cicli di 15 s a 95°C, 1 minuto a 57°C, 1 minuto a 72°C e un punto finale di estensione di 10 minuti ai prodotti di 72°C. PCR sono stati separati tramite l'elettroforesi capillare sull'analizzatore del PRISMA 310 di ABI (biosistemi applicati, sulla città adottiva, CA). I risultati sono stati analizzati con il GeneScan 3.1.2 e Genotyper 2.5.2 programmi (biosistemi applicati). Gli iniettori utilizzati per amplificare gli iniettori del microsatellite erano ATC di andata TTT-3_ di LEGGE TCT TGT del TCA GCA dell'iniettore 5_-TTG ed iniettore d'inversione 5_-TGT TTT AAG CCA IL ccc AAT IL TAT TTG-3_ (CSSM19); LEGGE di andata ATG GTT GAG-3_ dell'iniettore 5_-GGG AAG GTC CTA e LEGGE d'inversione TCT AAC TGC ATT GGA-3_ (CSSM42) dell'iniettore 5_-ACC ctc; TCA di andata CTA TAT GGC-3_ e CAT CAT-3_ (CSSM47) dell'iniettore 5_-TCT CTG TCT CTA dell'ACCUMULATORE d'inversione TGA AAC TAT dell'iniettore 5_-CTG GGC; iniettore di andata 5_-GGA GGG TTA CAG TCC ATG AGT TTG-3_ ed iniettore d'inversione 5_-TCG CGA TCC AAC TCC TCC TGA AG-3_ (CYP21); MODIFICA di andata GGC AGG CTG IL TDC G-3_ ed ATC AG-3_ (D5S2) dell'iniettore 5_-TAC TCG del TCA GGG TTG GTG dell'ACCUMULATORE d'inversione dell'iniettore 5_-GAG; ATC AAC ctc AGT C-3_ ed iniettore d'inversione 5_-CTG AGC TGG GGT GGG AGC TAT AAA TA-3_ (INRA006) di ATC di andata TGT dell'iniettore 5_-AGG AAT; iniettore di andata 5_-AAA GGC CAG AGT ATG CAA TTA GGA G-3_ e CAT d'inversione G-3_ (MAF65) dell'iniettore 5_-CCA ctc ctc CTG AGA ATA TAA; ed ATC di andata AGC AAA CCT-3_ dell'iniettore 5_-CAG CAA AAT e GCC d'inversione TTT A-3_ (RM4) dell'iniettore 5_-CCA il TDC GGG AAG.

***Brucella abortus* transformation.** The plasmid pBBR1MCS-6Y (31) carrying the green fluorescent protein (GFP) gene constitutively expressed in *B. abortus* was kindly provided by M. E. Kovach (Baldwin-Wallace College, Berea, OH).

The plasmid was introduced into *B. abortus* 2308 by electroporation, and the transformed bacteria (*GFP-B. abortus*) were grown in tryptose soy broth supplemented with 15 μ g/ml chloramphenicol.

In vitro infection of peripheral blood mononuclear cells with *GFP-B. abortus*.

Peripheral blood mononuclear cells were separated by density gradient centrifugation (Lympholyte-Mammal; Cederlane, Hornby, Ontario, Canada; 1,200 μ g for 20 min), distributed in 24-well plates (5 \times 10⁶ cells/well), and incubated overnight (37°C; 5% CO₂) in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with water buffalo serum (4%) and penicillin and streptomycin (100 IU/ml). Wells were washed with DMEM to remove nonadherent cells. Cells were fed with DMEM medium supplemented with 10% water buffalo serum and penicillin and streptomycin (100 IU/ml) until infected. The wells were washed with DMEM to remove the antibiotics and then infected with *GFP-B. abortus* (10⁶ bacteria and 10⁶ adherent cells in 500 μ l volume/well). The plates were centrifuged (750 μ g for 5 min) to facilitate cell contact and then incubated for 30 min at 37°C in 5% CO₂. Extracellular bacteria were killed with gentamicin (12.5 μ g/well). Cells were washed with DMEM, gently scraped from the tissue culture wells, and analyzed by fluorescent microscopy (Leica DMRA; Wetzlar, Germany) or flow cytometry (Epics Elite flow cytometer; Coulter, Miami, Florida).

Viability of intracellular bacteria. Monocytes were infected with *B. abortus* 2308 as described above. Following incubation (12 to 48 h), monocytes were washed with phosphate-buffered saline (PBS), lysed with 0.50% Tween 20 (40 μ l/600 μ l), washed again with PBS (to remove Tween 20), plated for CFU counting or stained with 100 nM SYTO9 and 15 μ M propidium iodide (Molecular Probes, Eugene,

Oregon) for 15 min in the dark, and analyzed by flow cytometry. For bacterial enumeration by flow cytometry, a fixed volume (75 μ l) of sample was analyzed (22). The two counting methods (flow cytometry and CFU counting) displayed high correlation ($r = 1.06 \times 10^{-1}$; $R^2 = 0.99$). In the

assay, viable bacteria stain green, whereas dead bacteria stain red. The assay was carried out according to the manufacturer's instructions.

Influence of the *Nramp1* genotype on milk yield. Milk yield was determined from monthly sampling collected by representatives of the National Dairy Association.

Individual milk yields were normalized (to the milk yield of a water buffalo cow at its fifth lactation, milked twice per day, with a lactation length of 270 days) using PUMA software (www.aia.it). Milk yield differences between genotypes were analyzed by Student's *t* test.

Trattamento della brucella aborto. Il plasmide pBBR1MCS-6Y (31) che trasporta il gene fluorescente verde della proteina (GFP) essenzialmente espresso nell'aborto del B. è stato fornito gentilmente dal M. il E. Kovach (università di Baldwin-Wallace, Berea, OH). Il plasmide è stato introdotto nell'aborto 2308 del B. dal electroporation e nei batteri trasformati (GFP-B. l'aborto) si è sviluppato in brodo della soia del triptosio completato con un cloramfenicolo di 15 μ g/ml. Infezione in vitro delle cellule mononucleari di anima periferica con GFP-B. aborto. Le cellule mononucleari di anima periferica sono state separate tramite centrifugazione di pendenza di densità (Lympholyte-Mammifero; Cederlane, Hornby, Ontario, Canada; 1.200 μ g per 20 minuti), distribuiti in 24 piastre buone (5 \times 10⁶ cellule/buoni) ed incubati durante la notte (37°C; CO₂ di 5%) nel mezzo modificato dell'aquila del Dulbecco (DMEM) completato con il siero del bufalo dell'acqua (4%) e penicillina e streptomina (100 IU/ml). I pozzi sono stati lavati con DMEM per rimuovere le cellule nonaderenti. Le cellule sono state alimentate con il mezzo di DMEM completate con il siero del bufalo dell'acqua di 10% e penicillina e streptomina (100 IU/ml) fino all'infettato a. I pozzi sono stati lavati con DMEM per rimuovere gli antibiotici ed allora sono stati infettati con GFP-B. aborto (10⁶ batteri e 10⁶ cellule aderenti in un volume dei 500 μ l/buoni). Le piastre sono state centrifugate (750 μ g per 5 minuti) per facilitare il contatto delle cellule ed allora sono state incubate per 30 minuti a 37°C in CO₂ di 5%. I batteri extracellulari sono stati uccisi con gentamicina (12.5 μ g/well). Le cellule sono state lavate con DMEM, raschiato delicatamente dai pozzi della coltura del tessuto ed analizzato da microscopia fluorescente (Leica DMRA; Wetzlar, la Germania) o fluiscono cytometry (cytometer di flusso dell'elite dei Epics; Coltro, Miami, Florida). Attuabilità dei batteri intracellulari. Monocytes è stato infettato con l'aborto 2308 del B. come precedentemente descritto. A seguito di incubazione (12 a 48 h), i monocytes sono stati lavati con salino tamponato con i fosfati (PBS), lysed con 0.50% Tween 20 (μ l 40 μ l/600), sono stati lavati ancora con PBS (per eliminare Tween 20), sono stati placcati per CFU che conta o sono stati macchiati con 100 il nanometro SYTO9 e lo ioduro di propidium dei 15 μ M (sonde molecolari, Eugene, Oregon) per 15 minuti nell'oscurità e sono stati analizzati tramite flusso cytometry. Per enumerazione batterica tramite flusso cytometry, un volume fisso (μ l 75) del campione è stato analizzato (22). I due metodi di conteggio (flusso cytometry e CFU che conta) hanno visualizzato l'alta correlazione ($r = 1.06 \times 10^{-1}$; $R^2 = 0.99$). In l'analisi, batteri possibili macchia il verde, mentre i batteri guasti macchiano il colore rosso. L'analisi è stata effettuata secondo le istruzioni del fornitore. Influenza del genotipo *Nramp1* sul rendimento del latte. Il rendimento del latte è stato determinato a partire dal campione mensile raccolto dai rappresentanti dell'associazione nazionale della latteria. I diversi rendimenti del latte sono stati normalizzati (al rendimento del latte di una mucca del bufalo dell'acqua alla relativa quinta lattazione, munto due volte al giorno, con una lunghezza di lattazione di 270 giorni) usando il software del PUMA (www.aia.it). Le differenze del rendimento del latte fra i genotipi sono state analizzate dalla prova di *t* dell'Student.

Assay of the reactive oxygen intermediates. When the fluorochrome 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCF) crosses the cell membrane, it undergoes deacetylation by intracellular esterases and becomes nonfluorescent. Upon oxidation by reactive oxygen intermediates (ROIs), DCF becomes again fluorescent (6). To measure the production of ROIs, monocytes (10⁶ cells suspended in 250 μ l

PBS) were incubated with DCF (Sigma) (final concentration, 0.4 μ M) at 37°C for 15 min in humidified atmosphere in the presence of 5% CO₂, washed with PBS, resuspended in the same medium (106 monocytes/250 μ l), infected with *B. abortus* (106 CFU for 20 min), washed with PBS, and finally analyzed by flow cytometry.

Assay of the reactive nitrogen intermediates (RNIs). The test was carried out as previously described (15). Briefly, monocytes (106/well), noninfected or infected with *B. abortus* (106 CFU/well for 48 h), were suspended in DMEM medium containing 10% water buffalo serum. The cell culture supernatant (100 μ l) was mixed with an equal volume of Griess reagent (15) and incubated at room temperature for 10 min, and the absorbance was read at 550 nm in a spectrophotometer (Bio-Rad, Hercules, CA) using sodium nitrite (5 μ M to 80 μ M) as the standard.

Ultrastructural analysis of *B. abortus*-infected cells. Monocytes (106) were infected with *B. abortus* (108 CFU suspended in 1 ml medium) for 5 min at 37°C, washed with PBS to remove nonadherent bacteria, and incubated at 37°C for 15 min, 2 h, or 24 h. Cells were then fixed with 2% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4), washed with the same buffer, and postfixed with 1% OsO₄ (1 h). The pellet was then dehydrated with ethanol and embedded in Epon 812 resin. Following polymerization (70°C for 24 h), the ultrathin sections were stained on grid with uranyl acetate, followed by lead citrate, and examined with a Zeiss (Milan, Italy) type 902A electron microscope at 80 kV.

Other procedures. The skin test was carried out using the Brucellergene OCB (Synbiotics, Lyon, France) according to the manufacturer's instructions. Agglutination and complement fixation tests were carried out as previously described (3). The Nramp1 expression level was determined as previously described (7). *B. abortus* DNA was identified by real-time PCR (34). The odds ratio, the confidence interval (CI) of the odds ratio, and data for Fisher's exact test and Student's *t* test were calculated as previously described (30). Before calculating the odds ratio, 0.5 was added to each of the four values since one of the values was 0 (30). Confidence intervals were calculated according to Woolf's method (30). Hardy-Weinberg equilibrium was calculated as previously described (10).

The degrees of freedom of the χ^2 test for Hardy-Weinberg equilibrium were calculated according to the formula $k(k-1)/2$, where *k* is the number of alleles (39).

Nucleotide sequence accession numbers. The complete nucleotide sequences of the four alleles can be found in the GenBank/DDBJ/EMBL databases under the accession numbers DQ095780, DQ095781, DQ376109, and DQ376110.

RESULTS

Allele identification at the *Nramp1* locus. A preliminary study established an association between the *Nramp1* BB genotype and the absence of anti-*B. abortus* antibodies in water buffaloes. The same study reported the identification of 6 out of 64 water buffaloes that were BB and positive for the *B. abortus* tests at the same time (7). As a limit in the analytical power of the technique used in the preliminary study (denaturing gradient gel electrophoresis) was suspected, 166 triads (father, mother, and offspring) and the 6 exceptional animals were tested by capillary electrophoresis. This technique displayed the presence of four alleles, *Nramp1A*, -B, -C, and -D, at the *Nramp1* locus. Figure 1 shows the profile of subjects homozygous for each allele. Family data (the triads) indicated that the four alleles behave as codominant (data not shown).

Analisi degli intermediari reattivi dell'ossigeno. Quando il fluorocromo 2', il diacetato della diclorofluorescina 7' (DCF) attraversa la membrana delle cellule, subisce il deacetylation dalle esterasi intracellulari e diventa non fluorescente. Su ossidazione dagli intermediari reattivi dell'ossigeno (ROIs), DCF diventa ancora fluorescente (6). Per misurare la produzione di ROIs, i monocytes (106 cellule sospese 250 nel μ l PBS) sono stati incubati con DCF (sigma) (concentrazione finale, 0.4 μ M) a 37°C per 15 minuti in atmosfera umidificata in presenza del CO₂ di 5%, lavato con PBS, risospeso nello stesso mezzo (μ l 106 monocytes/250), infettato con l'aborto del B. (106 CFU per 20 minuti), lavato con PBS ed infine analizzato tramite flusso cytometry. Analisi degli intermediari reattivi dell'azoto (RNIs). La prova è stata effettuata come precedentemente descritto (15). Brevemente, i monocytes (106/well), non infetti o infettata con l'aborto del B. (106 CFU/well per 48 h), sono stati sospesi nel mezzo di DMEM che contiene il siero del bufalo dell'acqua di 10%. Il galleggiante della coltura delle cellule (μ l 100) è stato mescolato con un volume uguale del reagente di Griess (15) ed è stato incubato alla temperatura ambiente per 10 minuti e la capacità di assorbimento è stato letto a 550 nanometro in uno spettrofotometro (Bio--Rad, Ercole, CA) usando il nitrito di sodio (μ M 5 a μ M 80) come il campione. L'analisi ultrastrutturale del B. aborto-ha infettato le cellule. Monocytes (106) è stato infettato con l'aborto del B. (108 CFU sospesi in un mezzo di 1 ml) per 5 minuti a 37°C, è stato lavato con PBS per rimuovere i batteri nonadherent ed è stato incubato a 37°C per 15 minuti, 2 h, o 24 cellule del H. allora è stato riparato con la glutaraldeide di 2% in una soluzione tampone a base di fosfato da 0.1 m. (pH 7.4), è stato lavato con lo stesso amplificatore ed è stato aggiunto alla fine con 1% OsO₄ (1 h). La pallina allora è stata disidratata con etanolo ed è stata incastonata in resina di Epon 812. A seguito di polimerizzazione (70°C per 24 h), le sezioni ultrathin sono state macchiate sulla griglia con l'acetato dell'uranile, sono state seguite dal citrato

del piombo e sono state esaminate con un tipo microscopio elettronico di Zeiss (Milano, Italia) di 902A a 80 chilovolt. Altre procedure. La prova della pelle è stata effettuata usando il Brucellergene OCB (Synbiotics, Lione, Francia) secondo le istruzioni del fornitore. L'agglutinazione e le prove di fissazione di complemento sono state effettuate come precedentemente descritto (3). Il livello di espressione *Nramp1* è stato determinato come precedentemente descritto (7). Il DNA dell'aborto del B. è stato identificato da PCR in tempo reale (34). Il rapporto di probabilità, l'intervallo di riservatezza (ci) del rapporto di probabilità ed i dati per il pescatore esigono la prova e la prova di t dell'allievo è stata calcolata come precedentemente descritto (30). Prima della calcolazione del rapporto di probabilità, 0.5 è stato aggiunto a ciascuno dei quattro valori poiché uno dei valori era 0 (30). Gli intervalli di riservatezza sono stati calcolati secondo il metodo del Woolf (30). L'equilibrio hardy-Weinberg è stato calcolato come precedentemente descritto (10). I gradi della libertà della prova χ^2 per equilibrio hardy-Weinberg sono stati calcolati secondo la formula $K(K-1)/2$, dove K è il numero di alleli (39). Numeri di accessione di sequenza del nucleotide. Le sequenze complete del nucleotide dei quattro alleli possono essere trovate nelle basi di dati di GenBank/DDBJ/EMBL sotto i numeri di accessione DQ095780, DQ095781, DQ376109 e DQ376110. RISULTATI Identificazione dell'allele al luogo *Nramp1*. Uno studio preliminare ha stabilito un'associazione fra il genotipo di *Nramp1* BB e l'assenza di anti-B. anticorpi dell'aborto nei bufali dell'acqua. Lo stesso studio ha segnalato l'identificazione di 6 su 64 bufali dell'acqua che erano BB e positive per le prove dell'aborto del B. allo stesso tempo (7). Mentre un limite nell'alimentazione analitica della tecnica usata nello studio preliminare (che denatura elettroforesi del gel di pendenza) è stato ritenuto sospetto, 166 triadi (padre, madre e prole) ed i 6 animali eccezionali sono stati esaminati tramite l'elettroforesi capillare. Questa tecnica ha visualizzato la presenza di quattro alleli, *Nramp1A*, - B, - C e - D, al luogo *Nramp1*. Figura 1 mostra il profilo degli oggetti homozygous per ogni allele. I dati della famiglia (le triadi) hanno indicato che i quattro alleli si comportano come codominant (dati non indicati).

As for the six exceptional animals, four displayed the *CD* genotype and two displayed the *BD* genotype.

The *BB* genotype confers resistance to *B. abortus* infection.

A sample of 413 water buffaloes, independent of the sample included in the preliminary study (7), was analyzed by capillary electrophoresis. Genotype analysis showed that the *BB* homozygous subjects were all found among the 271 controls (the animals exposed to *B. abortus* but negative by the *B. abortus* tests) (Table 1). The data reported in Table 1 were used to calculate the odds ratio (the ratio of the odds of being positive to the *B. abortus* tests for the *BB* and the non-*BB* subjects). The odds ratio was 0.07, and its 95% CI was 0.004 to 1.139.

Thus, *BB* animals are 7% as likely as non-*BB* animals to be positive to *B. abortus* tests. The same data were compared by Fisher's exact test. The two-sided *P* value was 0.0060, indicating that there would be a less than 0.6% chance of randomly picking animals with so much association if the *BB* genotype and the *B. abortus*-negative status were not associated.

The *Nramp1* alleles are not in Hardy-Weinberg equilibrium in seropositive water buffaloes.

The Hardy-Weinberg law states that, under certain assumptions (such as the absence of selection, stratification, or genetic drift), allele frequencies can be used to calculate the expected genotype frequencies (10). In the present study, this fundamental principle of population genetics was exploited to exclude the presence of stratification in the sample being studied, a condition which could vitiate the interpretation of the results (33), and to gain further supportive evidence for the association between the *Nramp1 BB* genotype and the *B. abortus*-negative status. The 142 brucellosis cases and 271 controls included in the association study were therefore screened separately for the deviation of genotype distribution from the Hardy-Weinberg law at eight polymorphic microsatellite marker loci and the *Nramp1* locus. Genotype frequencies at the marker loci were in Hardy-Weinberg equilibrium among brucellosis cases as well as among controls ($P > 0.30$ to 0.50), excluding the presence of stratification in the population sample being studied (data not shown). Genotype frequencies at the *Nramp1* locus were in Hardy-Weinberg equilibrium among controls ($P > 0.20$) (Table 2), but not among brucellosis cases ($P < 0.001$) (Table 3). Since a disequilibrium generated by the failure of any of the assumptions of the Hardy-Weinberg law was expected to influence both cases and controls, the evidence that only the cases do not fulfill the Hardy-Weinberg law, supports the results from the case-control study.

Per quanto riguarda i sei animali eccezionali, quattro hanno visualizzato il genotipo del *CD* e due hanno visualizzato il genotipo di *BD*. Il genotipo di *BB* conferisce resistenza all'infezione dell'aborto del B. Un campione di 413 bufali

dell'acqua, indipendente dal campione incluso nello studio preliminare (7), è stato analizzato tramite l'elettroforesi capillare. L'analisi di genotipo ha indicato che gli oggetti homozygous tutti di BB sono stati trovati fra il 271 comando (gli animali esposti all'aborto ma alla negazione del B. dall'aborto del B. esamina) (tabella 1). I dati hanno segnalato in tabella 1 sono stati usati calcolare il rapporto di probabilità (il rapporto delle probabilità di essere positivo all'aborto del B. esamina a BB e ad oggetti del non-BB). Il rapporto di probabilità era 0.07 ed il relativo ci di 95% era 0.004 - 1.139. Quindi, gli animali di BB sono 7% probabili quanto gli animali del non-BB essere positivi alle prove dell'aborto del B. Gli stessi dati sono stati confrontati dalla prova esatta del Fisher. Il valore fronte/retro di P era 0.0060, indicante che ci sarebbe il più meno di 0.6% probabilità a caso di selezione degli animali con così tanto l'associazione se il genotipo di BB e la condizione aborto-negativa del B. non fossero collegati. Gli alleli *Nramp1* non sono nell'equilibrio hardy-Weinberg nei bufali sieropositivi dell'acqua. La legge hardy-Weinberg dichiara quel, in determinati presupposti (quale l'assenza della selezione, della stratificazione, o della direzione genetica), le frequenze dell'allele può essere usata calcolare le frequenze previste di genotipo (10). Nello studio presente, questo principio fondamentale della genetica della popolazione è stato sfruttato per escludere la presenza della stratificazione nel campione che sono studiati, in una circostanza che potrebbe vitiare l'interpretazione dei risultati (33) e per guadagnare ulteriore prova di appoggio per l'associazione fra il genotipo di *Nramp1* BB e la condizione aborto-negativa del B. I 142 casi di brucellosi e 271 comando inclusi nello studio di associazione quindi sono stati selezionati esclusivamente per la deviazione di distribuzione di genotipo dalla legge hardy-Weinberg ad otto luoghi polimorfici dell'indicatore del microsatellite ed al luogo *Nramp1*. Le frequenze di genotipo ai luoghi dell'indicatore erano nell'equilibrio hardy-Weinberg fra i casi di brucellosi così come fra i comandi ($P = 0.30 - 0.50$), a parte la presenza della stratificazione nel campione della popolazione che è studiato (dati non indicati). Le frequenze di genotipo al luogo *Nramp1* erano nell'equilibrio hardy-Weinberg fra i comandi ($P = 0.20$) (tabella 2), ma non fra i casi di brucellosi ($P = 0.001$) (tabella 3). Poiché uno squilibrio generato tramite il guasto di c'è nei presupposti della legge hardy-Weinberg si è pensato che influenzi sia i casi che i comandi, la prova che soltanto i casi non compiono la legge hardy-Weinberg, sostiene i risultati dallo studio di contenitore-controllo.

Culling of seropositive animals increases the frequency of the BB genotype. The infection of the BB water buffaloes with a virulent *B. abortus* strain, an experiment which could provide direct proof of the protection conferred by the BB genotype, was vetoed by the sanitary authority (7). Field studies, however, produced dividends in another direction, providing the possibility of testing a herd where (thanks to the goodwill of the owner) a control program against brucellosis had been in operation for several years. The approach consisted of the rapid and systematic culling of the subjects who were positive for brucellosis by the serological tests (agglutination and complement fixation). In this herd, now brucellosis free, about 17% (36 out of 215) of the lactating cows are BB, a considerably higher percentage than that (4.8%, or 13 out of 271) found among the seronegative lactating cows included in the present study (Table 2). Although the frequency of the BB genotype before the control program was started is not known, the result, as it stands, suggests that the BB genotype may well have played a central role in the outcome of *B. abortus* infection, at least in this herd.

***Nramp1* expression level in AA and BB monocytes.** The level of the *Nramp1* messenger expressed by the AA and BB monocytes was measured by real time PCR before and after in vitro infection with *B. abortus* 2308 (10⁶ CFU/well). The experiment was carried out on 10 susceptible (AA) and 10 resistant (BB) animals, all negative by the *B. abortus* tests. Each animal was tested in two independent experiments, each time in triplicate.

The two blood samples were collected at 1-month intervals.

Noninfected BB monocytes displayed basal levels of *Nramp1* messenger approximately fivefold higher than those of the noninfected AA monocytes. Upon infection, the level of the *Nramp1* messenger in the BB monocytes peaked in 6 h and then declined to the basal level in approximately 24 h; in the AA monocytes, the level of the *Nramp1* messenger peaked in 24 h and remained up-regulated (20 to 40 times the basal level) for the following 24 h. The peak level of the *Nramp1* messenger was significantly higher in BB than in AA monocytes (Fig. 2).

La raccolta degli animali sieropositivi aumenta la frequenza del genotipo di BB. L'infezione dei bufali dell'acqua di BB con uno sforzo virulento dell'aborto del B., un esperimento in grado di fornire la prova diretta della protezione ha conferito dal genotipo di BB, era vetoed dall'autorità sanitaria (7). Gli studi diretti, tuttavia, hanno prodotto i dividendi in un altro senso, fornente la possibilità di esame del gregge in cui (grazie a benevolenza del proprietario) un programma di controllo contro brucellosi era stato in funzione per parecchi anni. Il metodo ha consistito della raccolta veloce e sistematica degli oggetti che erano positivi per brucellosi dalle prove sierologiche (fissazione di complemento e dell'agglutinazione). In questo gregge, ora la brucellosi liberamente, circa 17% (36 su 215) delle vacche allattanti è BB, una percentuale considerevolmente più alta che quello (4.8%, o 13 su 271) trovato fra le vacche allattanti sieronegative incluse nello studio presente (tabella 2). Anche se la frequenza del genotipo di BB prima che il programma di controllo sia iniziato non è conosciuta, il risultato, mentre si leva in piedi, indica che il genotipo di BB può scaturire ha svolto un ruolo centrale nel risultato dell'infezione dell'aborto del B., almeno in questo gregge. Livello di espressione Nrampl nei monocytes di BB e di aa. Il livello del messaggero Nrampl espresso dai monocytes di BB e di aa è stato misurato tramite l'infezione prima e dopo in vitro in tempo reale di PCR con l'aborto 2308 (106 CFU/well) del B. L'esperimento è stato effettuato su 10 suscettibili (aa) e su 10 (BB) animali resistenti, interamente negazione dalle prove dell'aborto del B. Ogni animale è stato esaminato in due esperimenti indipendenti, ogni volta in triplice copia. I due campioni di anima sono stati raccolti a intervalli di un mese. I monocytes non infetti di BB hanno visualizzato i livelli basali del messaggero Nrampl approssimativamente cinque volte più superiore a quelli dei monocytes non infetti di aa. Sull'infezione, il livello del messaggero Nrampl nei monocytes di BB ha alzato in 6 h ed allora ha declinato al livello basale in circa 24 h; nei monocytes di aa, il livello del messaggero Nrampl ha alzato in 24 h ed è rimasto in su-regolato (20 - 40 volte il livello basale) per i seguente 24 H. Il livello elevato peak del messaggero Nrampl era significativamente in BB che nei monocytes di aa (2).

Number of intracellular bacteria in AA and BB monocytes.

Real-time PCR experiments are often criticized for not being consistently reproducible (8, 25, 36). The biological activity of the AA and BB monocytes was therefore studied by additional approaches. The monocytes from AA and BB animals (the same used in the experiment described above) were infected in vitro with *GFP-B. abortus* (10⁶ CFU/well) and then analyzed by flow cytometry and fluorescence microscopy. Both techniques showed that at 24 h after infection, BB monocytes harbored a reduced number of intracellular bacteria compared with that by AA monocytes. Representative images of the results obtained testing the monocytes from 10 AA and 10 BB subjects are shown in Fig. 3 and 4.

Next, the study focused on establishing whether BB monocytes killed intracellular bacteria more efficiently than did AA monocytes. To answer this question, the monocytes from AA and BB animals were infected with *B. abortus* 2308 and the percentage of viable (SYTO9 stained) intracellular bacteria was determined by flow cytometry at 12, 24, and 48 h after infection. Within this time frame, the percentage of viable intracellular bacteria rose from 62% \pm 2.95 to 80% \pm 4.06 in the AA monocytes, while it remained almost constant (about 40% \pm 2.80) in the BB monocytes (Fig. 5). The viable bacteria present inside the AA and BB monocytes were also counted by the CFU method. The results (Fig. 6) confirm the capacity of the BB monocytes to control the replication of intracellular *B. abortus* more efficiently than AA monocytes do. Figures 5 and 6 show results from 10 AA and 10 BB subjects. Taken together, these results provide biological support for the association between the *BB* genotype and resistance to *B. abortus* infection, thus confirming epidemiological data.

Production of reactive oxygen intermediates and reactive nitrogen intermediates in AA and BB monocytes. Upon activation by bacteria, macrophages exhibit an increased production of ROIs and RNIs, which are both the primary mediators of macrophage antibacterial activity (12). The monocytes from 10 BB subjects, noninfected as well as infected with *B. abortus*, displayed significantly higher ROI generation than the monocytes from 10 AA subjects (Table 4). The BB monocytes, when infected with *B. abortus*, also displayed a significantly higher production of RNIs. Noninfected AA and BB monocytes were instead indistinguishable (Table 5). Nonactivated monocytes in fact do not express nitric oxide synthase enzyme and therefore cannot produce measurable levels of RNIs (12).

Ultrastructural studies of AA and BB monocytes infected with *B. abortus*.

The intracellular traffic of *B. abortus* in AA and BB monocytes was also explored. At 2 h postinfection, individual phagosomes (characterized by walls tightly apposed to the bacteria) prevail in the AA monocytes, while phagolysosomes (spacious vesicles bearing one or more bacteria) prevail in the BB monocytes. In addition, BB monocytes show evident cell activation processes (Fig. 7). Thus, the

Nramp1 gene apparently controls the intracellular bacterial replication by several means, such as the production of ROIs and RNIs and the activation of phagocytic cells.

Numero di batteri intracellulari nei monocytes di BB e di aa. Gli esperimenti in tempo reale di PCR sono criticati spesso per non essere costantemente riproducibili (8, 25, 36). L'attività biologica dei monocytes di BB e di aa quindi è stata studiata tramite i metodi supplementari. I monocytes dagli animali di BB e di aa (gli stessi usati nell'esperimento descritto precedentemente) sono stati infettati in vitro con GFP-*B. abortus* (106 CFU/well) ed allora analizzato da flusso cytometry e da microscopia di fluorescenza. Entrambe le tecniche hanno indicato che a 24 h dopo l'infezione, i monocytes di BB harbored un numero ridotto di batteri intracellulari rispetto a quello dai monocytes di aa. Le immagini rappresentative dei risultati ottenuti verificando i monocytes da 10 di BB 10 e di aa oggetti sono indicate in 3 e 4. Dopo, lo studio messo a fuoco sulla stabilizzazione se i monocytes di BB hanno ucciso più efficientemente i batteri intracellulari di monocytes di aa. Per rispondere a questo problema, i monocytes dagli animali di BB e di aa sono stati infettati con l'aborto 2308 del *B.* e la percentuale (SYTO9 macchiato) dei batteri intracellulari possibili è stata determinata tramite flusso cytometry a 12, a 24 e a 48 h dopo l'infezione. All'interno di questa struttura di tempo, la percentuale dei batteri intracellulari possibili è aumentato da 62% _ 2.95 a 80% _ 4.06 nei monocytes di aa, mentre è rimasto quasi costante (circa 40% _ 2.80) nei monocytes di BB (5). I batteri possibili presenti all'interno dei monocytes di BB e di aa inoltre sono stati contati con il metodo di CFU. I risultati (6) confermano la capacità dei monocytes di BB di controllare la replica dell'aborto intracellulare del *B.* più efficientemente dei monocytes di aa. Risultati di esposizione di figure 5 e 6 da 10 di BB 10 e di aa oggetti. Preso insieme, questi risultati forniscono il supporto biologico per l'associazione fra il genotipo di BB e la resistenza all'infezione dell'aborto del *B.*, così confermando i dati epidemiologici. Produzione degli intermediari reattivi dell'ossigeno e degli intermediari reattivi dell'azoto nei monocytes di BB e di aa. Sull'attivazione dai batteri, i macrofagi esibiscono una produzione aumentata di ROIs e di RNIs, che sono gli entrambi mediatori primari di attività antibatterica del macrofago (12). I monocytes da 10 oggetti di BB, non infetti così come infettato con l'aborto del *B.*, generazione significativamente più alta visualizzata di ROI che i monocytes da 10 oggetti di aa (tabella 4). I monocytes di BB, una volta infettato con l'aborto del *B.*, anche visualizzato una produzione significativamente più alta di RNIs. I monocytes non infetti di BB e di aa erano preferibilmente indistinguibili (tabella 5). I monocytes non attivati in effetti non esprimono l'enzima nitrico di synthase dell'ossido e quindi non possono produrre i livelli misurabili di RNIs (12). Studi ultrastrutturali sui monocytes di BB e di aa infettati con l'aborto del *B.* Il traffico intracellulare dell'aborto del *B.* nei monocytes di BB e di aa inoltre è stato esplorato. Ad un postinfection di 2 h, i diversi phagosomes (caratterizzati dalle pareti apposed strettamente ai batteri) prevalgono nei monocytes di aa, mentre i phagolysosomes (vescicole spaziose che sopportano uno o più batteri) prevalgono nei monocytes di BB. In più, i monocytes di BB mostrano i processi evidenti di attivazione delle cellule (7). Quindi, il gene *Nramp1* controlla apparentemente la replica batterica intracellulare attraverso parecchi mezzi, quali la produzione di ROIs e di RNIs e l'attivazione delle cellule fagocitiche.

Resistance to *B. abortus* is polygenic. Upon incubation with GFP-*B. abortus*, the monocytes from 2 AA animals (2 out of 10) displayed flow cytometric profiles very close to those of the BB animals (a reduced number of intracellular bacteria). A posteriori, it was discovered that both these animals remained anti-*B. abortus* antibody negative (by the agglutination and complement fixation tests), although they were exposed to the pathogen for several years. The flow cytometric test was extended to 10 more animals (AA, AB, or CD) that shared the characteristic of remaining anti-*B. abortus* antibody-negative over several years of exposure to *B. abortus*. Again, the monocytes from these animals and those from BB animals were indistinguishable. A likely explanation is that, in addition to *Nramp1*, other genes might confer resistance to brucellosis. If this is the case, the infection of monocytes with GFP-*B. abortus* promises to become a valuable test for the identification of *B. abortus*-resistant animals.

Nramp1 alleles and milk production. Host resistance to pathogen infection sometimes carries a fitness cost (40). Therefore, it seemed crucial to ascertain whether the *BB* genotype adversely affected milk yield, the most important production trait for water buffalo breeders. No difference was found in milk yield between *BB* and *AC*, *AD*, *BD*, or *AC* cows ($t_{0.95}$, 0.08 to 1.3; degrees of freedom, 17 to 23).

The *BB* animals are *Brucella* DNA negative. The persistence of *Brucella* over extended periods of time in individuals apparently free of disease is well documented in both ruminants (17,35) and humans (41). *Brucella* DNA was sought in the blood of 10 *BB* animals. The *Brucella* DNA was examined by real-time PCR using an assay with a detection limit of 10 fg of *Brucella* DNA (five genome equivalents). Ten blood samples collected from each animal at an interval of approximately 2 weeks were all negative. The same assay detected the presence of *Brucella* DNA in the blood of 4 out of 10 anti-*B. abortus* antibodypositive subjects (antibody titer measured by the complement fixation test was 20 to 40 IU). The possibility that the 10 *BB* animals were all intermittent carriers cannot be excluded, but it seems remote. On the basis of the available evidence (negative results to the *B. abortus* tests and absence of *Brucella* DNA in the blood), the conclusion that *BB* water buffaloes are not carriers seems sufficiently prudent.

La resistenza all'aborto del *B.* è polygenic. Su incubazione con GFP-*B.* l'aborto, i monocytes da 2 animali di aa (2 su 10) ha visualizzato i profili cytometric di flusso molto vicino a quelli degli animali di *BB* (un numero ridotto di batteri intracellulari). A posteriori, è stato scoperto che entrambi questi animali sono rimasti anti-*B.* negazione dell'anticorpo dell'aborto (dall'agglutinazione e dalle prove di fissazione di complemento), anche se sono stati esposti all'agente patogeno per parecchi anni. La prova cytometric di flusso è stata estesa a 10 nuovi animali (aa, ab, o CD) che hanno ripartito la caratteristica di anti-*B.* restante. Aborto anticorpo-negativo in parecchi anni di esposizione all'aborto del *B.* Di nuovo, i monocytes da questi animali e quelli dagli animali di *BB* erano indistinguibili. Una spiegazione probabile è che, oltre che *Nramp1*, altri geni potrebbero conferire resistenza a brucellosi. Se questo è il caso, l'infezione dei monocytes con GFP-*B.* l'aborto promette di trasformarsi in una prova importante per l'identificazione degli animali aborto-resistenti del *B.* Alleli *Nramp1* e produzione di latte. La resistenza ospite all'infezione dell'agente patogeno a volte trasporta un costo di idoneità (40). Di conseguenza, ha sembrato cruciale accertare di se il genotipo di *BB* ha interessato avversamente il rendimento del latte, la caratteristica di produzione più importante per i selezionatori del bufalo dell'acqua. Nessuna differenza è stata trovata nel rendimento del latte fra le mucche di *BB* e di *CA*, dell'ANNUNCIO, di *BD*, o di *CA* ($t_{0.95}$, 0.08 - 1.3; gradi di libertà, 17 - 23). Gli animali di *BB* sono negazione del DNA della brucella. La persistenza dei periodi di tempo sovraestesi brucella in individui apparentemente esenti dalla malattia è ben documentata sia in ruminanti (17,35) che in esseri umani (41). Il DNA della brucella è stato cercato nell'anima di 10 animali di *BB*. Il DNA della brucella è stato esaminato secondo PCR in tempo reale usando un'analisi con un limite di segnalazione di fg 10 del DNA della brucella (cinque equivalenti del genome). Dieci campioni di anima hanno raccolto da ogni animale ad un intervallo di circa 2 settimane erano tutto negativi. La stessa analisi ha rilevato la presenza del DNA della brucella nell'anima di 4 su anti-*B.* 10. oggetti antibodypositive dell'aborto (il titolo dell'anticorpo misurato dalla prova di fissazione di complemento era di 20 - 40 IU). La possibilità che i 10 animali erano tutti di *BB* elementi portanti intermittenti non può essere esclusa, ma esso sembra a distanza. In base alla prova disponibile (risultati negativi alle prove dell'aborto del *B.* ed all'assenza del DNA della brucella nell'anima), la conclusione che i bufali dell'acqua di *BB* non sono elementi portanti sembra sufficiente prudente.

DISCUSSION

At present, the control of brucellosis (in water buffalo as well as in other species) is based on the serological identification and slaughter of infected (seropositive) animals. Latent infections, prolonged incubation periods of the disease, and inadequate protection provided by vaccination limit the success of this approach. We are exploring an alternative solution: the control of brucellosis by selective breeding. The results reported here demonstrate that the approach is feasible.

Case-control studies can detect associations between host genes and disease resistance very efficiently (4, 16, 27). The design of these studies is also conceptually simple: the frequency of the allele conferring resistance in a sample of cases is compared with the frequency in a sample of controls. The expectation is that the allele conferring resistance will display a higher frequency among the controls. However, well-designed association studies require the absence of stratification in the source population (33). Only in this case does the

genotype distribution observed in the cases also represent the genotype distribution in the controls. Stratification occurs when the population under study contains genetically different groups (or strata) as a result of selection, inbreeding, or other forms of non-random mating. In the present study, the distribution of the alleles at eight distinct loci among cases and controls fulfills the Hardy-Weinberg law. Any potential bias introduced by stratification can therefore be excluded. In this context, the lack of Hardy-Weinberg equilibrium between cases and controls observed at the *Nramp1* locus (Tables 2 and 3) becomes strong evidence for the correlation between the *BB* genotype and resistance to *B. abortus* infection. Actually, the test for Hardy-Weinberg disequilibrium in a gene bank of affected individuals has been proposed as a valid method of searching for disease-susceptible loci (16).

The biological plausibility of the candidate gene is also a critical requisite for an association study. Here the function of *Nramp1* has been exploited in the AA (susceptible) and BB (resistant) animals by using independent approaches. The *Nramp1* basal expression level was much higher in BB than in AA animals. When the monocytes were infected in vitro with *B. abortus*, the expression of *Nramp1* lasted at a sustained level for about 24 h in the BB animals, but much longer in the AA animals (Fig. 2). These results suggest that the higher basal gene level gives the BB animals the opportunity to rapidly oppose the pathogen during the early hours of infection. The increased production of ROIs and RNIs (Tables 4 and 5) and earlier activation of the BB monocytes (Fig. 7) concur with the above interpretation and with the notion that innate immunity acts in the early hours after exposure to microorganisms (23).

DISCUSSION Attualmente, il controllo di brucellosi (nel bufalo dell'acqua così come nell'altra specie) è basato sull'identificazione e sul macello sierologici degli animali (sieropositivi) infettati. Le infezioni latenti, prolungate periodi di incubazione della malattia e protezione inadeguata hanno fornito dal limite di vaccinazione il successo di questo metodo. Stiamo esplorando una soluzione alternativa: il controllo di brucellosi dall'allevamento selettivo. I risultati segnalati qui dimostrano che il metodo è fattibile. gli studi di Contenitore-controllo possono rilevare molto efficientemente le associazioni fra i geni ospite e la resistenza di malattia (4, 16, 27). Il disegno di questi studia è inoltre concettualmente semplice: la frequenza della resistenza di conferimento dell'allele in un campione dei casi è paragonata alla frequenza in un campione dei comandi. L'aspettativa è che la resistenza di conferimento dell'allele visualizzerà un'più alta frequenza fra i comandi. Tuttavia, gli studi ben progettati di associazione richiedono l'assenza della stratificazione nella popolazione di fonte (33). In questo caso fa soltanto la distribuzione di genotipo osservata nei casi inoltre rappresenta la distribuzione di genotipo dei comandi. La stratificazione accade quando la popolazione allo studio contiene i gruppi geneticamente differenti (o gli strati) come conseguenza della selezione, dell'accoppiamento, o di altre forme di corrispondersi non-casuale. Nello studio presente, la distribuzione degli alleli ad otto luoghi distinti fra i casi ed i comandi compie la legge hardy-Weinberg. Tutta la polarizzazione potenziale introdotta dalla stratificazione può quindi essere esclusa. In questo contesto, la mancanza di equilibrio hardy-Weinberg fra i casi ed i comandi osservati *Nramp1* al luogo (tabelle 2 e 3) si trasforma in in prova ben fondata per la correlazione fra il genotipo di BB e la resistenza all'infezione dell'aborto del B. Realmente, la prova per squilibrio hardy-Weinberg in una banca del gene degli individui affected è stata proposta come metodo valido di ricerca dei luoghi malattia-suscettibili (16). La plausibilità biologica del gene del candidato è inoltre un requisito critico per uno studio di associazione. Qui la funzione di *Nramp1* è stata sfruttata negli animali (resistenti) di BB e) suscettibile (di aa usando i metodi indipendenti. Il livello elevato basale di espressione *Nramp1* era molto in BB che negli animali di aa. Quando i monocytes sono stati infettati in vitro con l'aborto del B., l'espressione di *Nramp1* ha durato molto più lungamente ad un livello continuo per circa 24 h negli animali di BB, ma negli animali di aa (2). Questi risultati indicano che il livello elevato basale del gene dà agli animali di BB l'occasione opporre velocemente l'agente patogeno durante le ore in anticipo dell'infezione. La produzione aumentata di ROIs e di RNIs (tabelle 4 e 5) e l'attivazione più iniziale dei monocytes di BB (7) concordano con la suddetta interpretazione e con la nozione che l'immunità innata si comporta nelle ore in anticipo dopo esposizione ai microorganismi (23).

The evidence that the BB monocytes rapidly destroy the pathogen (Fig. 5 and 6) perhaps also suggests why BB animals do not form anti-*B. abortus* antibodies upon contact with the pathogen: the ingested bacteria are rapidly destroyed by phagocytes, and the inflammatory

signaling is consequently too short to induce a systemic response (antibody production). What becomes striking here is the similarity in innate immune response between BB water buffaloes (resistant to *B. abortus* infection and specific antibody production) and that of CKR5_32/CKR5_32 individuals (resistant to human immunodeficiency virus infection and specific antibody production) (13). No single serological test can reliably differentiate between *B. abortus* and other bacteria (in particular *Yersinia enterocolitica* O:9) that share antigenic epitopes with *B. abortus* (18).

Here, cases and controls were diagnosed using a combination of tests. The cases were animals positive by the skin test, the complement fixation test, and the agglutination test. In particular, the skin test has been repeatedly shown to be the most specific test for brucellosis (18, 29). The controls were animals negative by the same tests. Many BB animals remained *B. abortus* antibody negative, though they were exposed for several years to *B. abortus*. This observation provides convincing evidence that BB animals are inherently resistant and not just subjects erroneously diagnosed as noninfected. At the same time, in view of the complex serological cross-reaction of *B. abortus* with other bacteria, we cannot formally exclude the possibility that pathogens other than *B. abortus* might have contributed to the higher frequency of the BB genotype observed in the herd where the culling of anti-*B. abortus*-positive subjects was carried out.

Several reports describing the *Nramp1* polymorphisms in cattle, zebu, and the water buffalo have been published recently. The relevance of these reports to the present data deserves a comment. Paixao et al. (32) found that Holstein (*Bos taurus taurus*) and Indian zebu (*Bos taurus indicus*) subjects resistant to brucellosis display the 3' UTR *Nramp1* genotype associated with resistance to the disease. On the contrary, Kumar et al. (26) found that, in the Indian zebu and crossbred (*Bos taurus indicus* × *Bos taurus taurus*) cattle, the same genotype is not associated with resistance to brucellosis. The Holstein animals screened by Paixao et al. (32) (81 animals) and the zebu or crossbred animals tested by Kumar et al. (26) (100 animals) were all homozygous for the allele conferring resistance. In the absence of data showing that alleles at unrelated loci are in Hardy-Weinberg equilibrium in cases and controls, the excess of homozygosity at the *Nramp1* locus points to either mistyping of genotypes or population stratification (33, 37). Since both of these conditions can lead to spurious conclusions (33, 37), the results from these studies (26, 32) require caution in their interpretation. Ables et al. (1) have described several *Nramp1* single-nucleotide polymorphisms present in bovine and water buffalo breeds. The authors did not investigate a possible association between these polymorphisms and resistance to brucellosis. The variants, located in introns 4 and 5 and in exon 5 of the *Nramp1* gene, are in any case distinct from the microsatellite polymorphism in the 3' UTR described in this study. Finally, the evidence that the *Nramp1* gene is not involved in the control of *B. melitensis* infection in mice (20) is not in conflict with the results reported here. First, the *Nramp1* polymorphisms in water buffalo (this paper) and in mice (38) are distinct, and direct comparison is therefore questionable; second, although the pathogen persists in the macrophages of both species, the disease in ruminants is localized in the reproductive system, while in mice it is localized in the reticuloendothelial system. Phrased another way, the role of *Nramp1* is very likely influenced by the host (mouse versus water buffalo).

In conclusion, this study demonstrates the feasibility of using selection to increase the frequency of genes providing resistance to infectious diseases. The approach may have a positive impact on the economics of the dairy industry and hopefully contribute to changing the culture of animal health control by slaughter.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank two anonymous reviewers for valuable comments on the manuscript; M. E. Kovach (Baldwin-Wallace College, Berea, OH) for the generous gift of the pBBR1MCS-6Y plasmid; Giuseppe Blaiotta (University of Naples Federico II) for help with electroporation; and Raffaele Garofalo and Giovanni Garofalo for collecting blood samples.

La prova che i monociti BB distruggono velocemente l'agente patogeno (5 e 6) forse inoltre suggerisce perchè gli animali di BB non formano il anti-B. anticorpi dell'aborto sul contatto con l'agente patogeno: i batteri ingeriti sono distrutti velocemente dai fagociti e la segnalazione infiammatoria è conseguentemente troppo corta per indurre una risposta sistematica (produzione dell'anticorpo). Che cosa diventa notevole qui è la somiglianza nella risposta immunitaria innata fra i bufali dell'acqua di BB (resistenti all'infezione dell'aborto del B. ed alla produzione specifica dell'anticorpo) e quello degli individui di CKR5_32/CKR5_32 (resistenti all'infezione umana del virus di immunodeficiency ed alla produzione specifica) dell'anticorpo (13). Nessuna prova sierologica può differenziare attendibilmente fra l'aborto del B. ed altri batteri (in particolare *Yersinia enterocolitica*: 9) epitopes antigenici di quella parte con l'aborto del B. (18). Qui, le casse ed i comandi sono stati diagnosticati usando una combinazione delle prove. I casi erano animali positivi dalla prova della pelle, dalla prova di fissazione di complemento e dalla prova di agglutinazione. In particolare, la prova della pelle è stata indicata ripetutamente per essere la la maggior parte prova specifica per brucellosi (18, 29). I comandi erano animali negativi dalle stesse prove. Molti animali di BB sono rimasto negazione dell'anticorpo dell'aborto del B., benchè fossero esposti per parecchi anni all'aborto del B. Questa osservazione fornisce convincere la prova che gli animali di BB sono oggetti inerentemente resistenti e giusti diagnosticati erroneamente come non infetti. Allo stesso tempo, in considerazione della reazione crociata sierologica complessa dell'aborto del B.

con altri batteri, non possiamo escludere formalmente la possibilità che gli agenti patogeni tranne l'aborto del B. potrebbero contribuire all'più alta frequenza del genotipo di BB osservato nel gregge in cui la raccolta del anti-B. gli oggetti aborto-positivi sono stati effettuati. Parecchi rapporti che descrivono i polimorfismi Nramp1 nei bestiami, nello zebù e nel bufalo dell'acqua sono stati pubblicati recentemente. L'attinenza di questi rapporti con dati attuali merita un commento. Paixao ed altri. (32) che l'Holstein (taurus del taurus di Bos) e gli oggetti indiani dello zebù (indicus del taurus di Bos) resistenti a brucellosi visualizzano il 3 _ il genotipo trovato di UTR Nramp1 si è associato con resistenza alla malattia. Al contrario, Kumar ed altri. (26) trovato che, nei bestiami indiani dell'ibrido e dello zebù (taurus del taurus di Bos di indicus del taurus di Bos _), lo stesso genotipo non è associato con resistenza a brucellosi. Gli animali dell'Holstein selezionati da Paixao ed altri. (32) (81 animale) e gli animali dell'ibrido o dello zebù hanno esaminato da Kumar ed altri. (26) (100 animali) erano tutti homozygous per la resistenza di conferimento dell'allele. In assenza della rappresentazione di dati che gli alleli ai luoghi indipendenti sono nell'equilibrio hardy-Weinberg nei casi e nei comandi, l'eccesso di homozygosity ai punti di luogo Nramp1 a mistyping dei genotipi o della stratificazione della popolazione (33, 37). Poiché entrambe circostanze possono portare alle conclusioni spurie (33, 37), i risultati da questi studi (26, 32) richiedono l'attenzione nella loro interpretazione. Ables ed altri. (1) hanno descritto parecchi polimorfismi del singolo-nucleotide Nramp1 presenti nelle razze del bufalo dell'acqua e del bovino. Gli autori non hanno studiato un'associazione possibile fra questi polimorfismi e resistenza a brucellosi. Le varianti, situate nei introns 4 e 5 e nel exon 5 del gene Nramp1, sono comunque distinte dal polimorfismo del microsatellite nei 3 _ UTR descritti in questo studio. Per concludere, la prova che il gene Nramp1 non è coinvolto nel controllo dell'infezione di melitensis del B. in mouse (20) non è dentro conflitto con i risultati segnalati qui. In primo luogo, i polimorfismi Nramp1 nel bufalo dell'acqua (questa carta) ed in mouse (38) sono confronto distinto e diretto è quindi discutibili; in secondo luogo, anche se l'agente patogeno persist nei macrofagi di entrambe le specie, la malattia in ruminanti è localizzata nel sistema riproduttivo, mentre in mouse è localizzata nel sistema reticuloendothelial. Ha esprim un altro senso, il ruolo di Nramp1 è molto probabile influenzato dall'ospite (mouse contro il bufalo dell'acqua). In conclusione, questo studio dimostra la fattibilità di usando la selezione per aumentare la frequenza dei geni che forniscono la resistenza alle malattie contagiose. Il metodo può avere un effetto positivo sull'economia dell'industria lattiera ed eventualmente contribuire a cambiare la coltura di controllo di salute degli animali tramite il macello. RINGRAZIAMENTI Ringraziamo due critici anonimi per le osservazioni importanti sul manoscritto; M.E. Kovach (università di Baldwin-Wallace, Berea, OH) per il regalo generoso del plasmide di pBBR1MCS-6Y; Giuseppe Blaiotta (università di Napoli Federico II) per aiuto con il electroporation; e Raffaele Garofalo e Giovanni Garofalo per la raccolta dei campioni di animali.

REFERENCES

1. Ables, G. P., M. Nishibori, M. Kanemaki, and T. Watanabe. 2002. Sequence analysis of the NRAMP1 genes from different bovine and buffalo breeds. *J. Vet. Med. Sci.* **64**:1081-1083.
2. Alter-Kultunoff, M., S. Ehrlich, N. Dror, A. Azriel, M. Eilers, H. Hauser, H. Bowen, C. H. Barton, T. Tamura, K. Ozato, and B. Z. Levi. 2003. Nramp-1 mediated innate resistance to intraphagosomal pathogens is regulated by IRT-8, PU.1 and Miz-1. *J. Biol. Chem.* **278**:44025-44032.
3. Alton, G. G., W. H. Jones, and D. E. Pietz. 1975. Laboratory techniques in brucellosis, p. 64-124. WHO monograph series 55. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
4. Anonymous. 1999. Freely associating. *Nat. Genet.* **22**:1-2.
5. Barthel, B., J. Feng, and J. A. Piedrahita. 2001. Stable transfection of the bovine NRAMP1 gene into murine RAW264.7 cells: effects on *Brucella abortus* survival. *Infect. Immun.* **69**:3110-3119.
6. Bass, D. A., J. W. Parce, L. R. Dechatelet, P. Szejda, M. C. Seeds, and M. Thomas. 1983. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J. Immunol.* **130**: 1910-1917.
7. Borriello, G., R. Capparelli, M. Bianco, D. Fenizia, F. Alfano, F. Capuano, D. Ercolini, A. Parisi, S. Roperto, and D. Iannelli. 2006. Genetic resistance to *Brucella abortus* in water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Infect. Immun.* **74**: 2115-2120.
8. Bustin, S. A., V. Benes, and M. W. Pfaff. 2005. Quantitative real-time RTPCR— a perspective. *J. Mol. Endocrinol.* **34**:597-601.
9. Cardon, L. R., and J. I. Bell. 2001. Association study designs for complex diseases. *Nat. Rev. Genet.* **2**:91-99.

10. Cavalli-Sforza, L. L., and W. F. Bodmer. 1971. The genetics of human populations, p. 39–70. W. H. Freeman and Co., San Francisco, CA.
11. Cellier, M., G. Prive, A. Belouchi, T. Kwan, V. Rodriguez, W. Chia, and P. Gros. 1995. The natural resistance associated macrophage protein (Nramp) defines a new family of membrane proteins conserved throughout evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:10089–10094.
12. Darrah, P. A., M. K. Hondalus, Q. Chen, H. Ischiropoulos, and D. M. Mosser. 2000. Cooperation between reactive oxygen and nitrogen intermediates in killing of *Rhodococcus equi* by activated macrophages. *Infect. Immun.* **68**:3587–3593.
13. Dean, M., M. Carrington, C. Winkler, G. A. Huttley, L. W. Smith, R. Allikmets, J. J. Goedert, S. P. Buchbinder, E. Vittinghoff, E. Gomperts, S. Donfield, D. Vlahov, R. Kaslow, A. Saah, C. Rinaldo, and R. Detels. 1996. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the *CCR5* structural gene. *Science* **273**:1856–1862.
14. De Massis, F., A. Di Girolamo, A. Petrini, E. Pizzigallo, and A. Giovannini. 2005. Correlation between animal and human brucellosis in Italy. *Clin. Microbiol. Infect.* **11**:632–636.
15. Ding, A. H., C. F. Nathan, and D. J. Stuehr. 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol.* **141**:2407–2412.
16. Feder, J. N., A. Gnirke, W. Thomas, Z. Tsuchihashi, D. A. Ruddy, A. Basava, F. Dormishian, R. Domingo, Jr., M. Ellis, A. Fullan, L. Hinton, L. Jones, B. Kimmel, G. Kronmal, P. Lauer, V. Lee, D. Loeb, F. Mapa, E. McClelland, N. Meyer, G. Mintier, N. Moeller, T. Moore, E. Morikang, C. Prass, L. Quintana, S. Starnes, K. Schatzman, K. Brunke, D. Drayna, N. Risch, R. Bacon, and R. Wolff. 1996. A novel class I like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat. Genet.* **13**:399–408.
17. Fitch, T. A. 2003. Intracellular survival of *Brucella*: defining the link with persistence. *Vet. Microbiol.* **92**:213–223.
18. Godfroid, J., C. Saegerman, V. Wellemans, K. Walraven, J. Letesson, A. Tibor, A. McMillan, S. Spencer, M. Sanna, D. Bakker, R. Puillot, and B. Garin-Bastuji. 2002. How to substantiate eradication of bovine brucellosis when aspecific serological reactions occur in the course of brucellosis testing. *Vet. Microbiol.* **90**:461–477.
19. Govoni, G., and P. Gros. 1998. Macrophage NRAMP1 and its role in resistance to microbial infections. *Inflamm. Res.* **47**:277–284.
20. Guilloteau, L. A., J. Dornand, A. Gross, M. Olivier, F. Cortade, Y. Le Vern, and D. Kerbueuf. 2003. Nramp1 is not a major determinant in the control of *Brucella melitensis* infection in mice. *Infect. Immun.* **71**:621–628.
21. Gruenheid, S., and P. Gros. 2000. Genetic susceptibility to intracellular infections: Nramp1, macrophage function and divalent cations transport. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**:43–48.
22. Hoefel, D., W. L. Grooby, P. T. Monisa, S. Andrews, and C. P. Sainza. 2003. Enumeration of water-borne bacteria using viability assays and flow cytometry: a comparison to culture-based techniques. *J. Microbiol. Methods* **55**: 585–597.
23. Hoffmann, J. A., F. C. Kafatos, C. A. Janeway, Jr., and R. A. Esekowitz. 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284**:1313–1318.
24. Horin, P., I. Rychlik, J. W. Templeton, and L. G. Adams. 1999. A complex pattern of microsatellite polymorphism within the bovine NRAMP1 gene. *Eur. J. Immunogenet.* **26**:311–313.
25. Huguet, J., K. Dheda, S. Bustin, and A. Zumla. 2005. Real-time RT-PCR normalization; strategies and considerations. *Genes Immun.* **6**:279–284.
26. Kumar, N., A. Mitra, I. Ganguly, R. Singh, S. M. Deb, S. K. Srivastava, and A. Sharma. 2005. Lack of association of brucellosis resistance with (GT)₁₃ microsatellite allele at 3' UTR of *Nramp1* gene in Indian zebu (*Bos indicus*) and crossbred (*Bos indicus* × *Bos taurus*) cattle. *Vet. Microbiol.* **111**:139–143.
27. Lander, E. S., and N. J. Schork. 1994. Genetic dissection of complex traits. *Science* **265**:2037–2047.
28. Lohmueller, K. E., C. L. Pearce, M. Pike, E. S. Lander, and J. N. Hirschhorn. 2003. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat. Genet.* **33**:177–182.
29. MacDiarmid, S. C. 1987. A theoretical basis for the use of a skin test for brucellosis surveillance in extensively managed cattle herds. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.* **6**:1029–1035.
30. Motulski, H. 1995. Intuitive biostatistics, p. 80–105. Oxford University Press, New York, NY.
31. Murphy, E., G. T. Robertson, M. Parent, S. D. Hagius, R. M. Roop, I. I. P. H. Elzer, and C. L. Baldwin. 2002. Major histocompatibility complex class I and II expression on macrophages containing a virulent strain of *Brucella abortus* measured using green fluorescent protein-expressing brucellae and flow cytometry. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **33**:191–200.
32. Paixao, T. A., C. Ferreira, A. M. Borges, D. A. Oliveira, A. P. Lage, and R. L. Santos. 2006. Frequency of bovine Nramp1 (Slc11a1) alleles in Holstein and zebu breeds. *Vet. Immun. Immunopathol.* **109**:37–42.
33. Pritchard, J. K., and N. A. Rosenberg. 1999. Use of unlinked genetic markers to detect population stratification in association studies. *Am. J. Hum. Genet.* **65**:220–228.
34. Queipo-Ortuno, M. I., J. D. Colmenero, J. M. Reguera, M. A. Garcia-Ordóñez, M. E. Pachon, M. Gonzalez, and P. Morata. 2005. Rapid diagnosis of human brucellosis by SYBR green I-based real-time PCR assay and melting curve analysis in serum samples. *Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **11**:713–718.
35. Ray, W. C., R. R. Brown, D. A. Stringfellow, P. R. Schunrrenberger, C. M. Scanlan, and A. I. Swan. 1988. Bovine brucellosis: an investigation of latency in progeny of culture-positive cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **192**:182–186.
36. Sundberg, R. 2005. Statistical modelling in case-control real-time RT-PCR assays, for identification of differently expressed genes in schizophrenia. *Biostatistics* **1**:1–22.
37. Thompson, D., J. S. Witte, M. Slattery, and D. Goldgar. 2004. Increased power for case-control studies of single nucleotide polymorphisms through incorporation of family history and genetic constraints. *Genet. Epidemiol.* **27**:215–224.
38. Vidal, S. M., D. Malo, K. Vogan, E. Skamene, and P. Gros. 1993. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for *Bcg*. *Cell* **73**:469–485.
39. Weir, B. S. 1996. Genetic data analysis II: methods for discrete population genetic data, p. 91–139. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
40. Woolhouse, M. E. J., J. P. Webster, E. Domingo, B. Charlesworth, and B. R. Levin. 2002. Biological and biomedical implications of the co-evolution of pathogens and their hosts. *Nat. Genet.* **32**:569–577.
41. Young, E. J. 1995. An overview of human brucellosis. *Clin. Infect. Dis.* **21**:283–290.

Editor: V. J. DiRita

996 CAPPARELLI ET AL. INFECT. IMMUN.

* Corresponding author. Mailing address: Cattedra di Immunologia, Dipartimento di Scienze Zootecniche e Ispezione degli Alimenti, Università degli Studi di Napoli Federico II, Via Università, 133, 80055, Portici, Naples, Italy. Phone: 39 081 2539277. Fax: 39 081 7762886. E-mail: iannelli@unina.it. Published ahead of print on 4 December 2006.

FIG. 1. Graphic representation of the *Nramp1A*, *-B*, *-C*, and *-D* alleles obtained from an ABI PRISM 310 analyzer. The amplification reaction yields DNA fragments of slightly different sizes. The size of each allele is given by the highest (most representative) peak, which is marked with an arrow.

TABLE 1. Association between the *BB* genotype and resistance to *B. abortus* infection^a Genotype No. of:

Total Cases Controls *BB* 0 13 13 Non-*BB* 142 258 400

Total 142 271 413 ^aThe odds ratio was 0.07; the CI (calculated according to Woolf's method) was 0.004 to 1.139. As determined by Fisher's exact test, the *P* value was ≤ 0.0060 .

1 Rappresentazione grafica del *Nramp1A*, *-B*, *-C* e *-D* gli alleli di D si sono verificati da un analizzatore del PRISMA 310 di ABI. La reazione di amplificazione

rende i frammenti del DNA dei formati un po' differenti. Il formato di ogni allele è dato dall'più alto (picco la maggior parte del rappresentante), che sia segnato con una freccia.

TABELLA 1. Associazione fra il genotipo di BB e la resistenza al genotipo di infettiva dell'aborto del B. no di: Comandi totali BB 0 di casi 13 13 Non-BB 142 258 400 Il totale 142 271 413 il rapporto di probabilità era 0.07; ci (calcolati secondo il metodo del Woolf) erano 0.004 - 1.139. Come determinato dalla prova esatta del Fisher, il valore di P era 0.0060.

TABLE 2. *Nramp1* genotype distribution among controls^a Genotype Frequencies of seronegative animals Observed Expected (formula for expected frequency)
AA 68 68 (n_{p2}) AB 73 68 (n_{2pq}) AC 21 27 (n_{2pr}) AD 42 41 (n_{2ps}) BB 13 17 (n_{q2}) BC 11 13 (n_{2qr}) BD 24 20 (n_{2qs}) CC 5 3 (n_{r2})
CD 11 8 (n_{2rs}) DD 3 6 (n_{s2}) Total 271 271 a p, q, r, and s indicate the observed frequencies of the *Nramp1A*, -B, -C, and -D alleles, respectively. $p_{(AA_{AB/2}_{AC/2}_{AD/2})/n_{0.50}}$; $q_{(BB_{AB/2}_{BC/2}_{BD/2})/n_{0.25}}$; $r_{(CC_{AC/2}_{BC/2}_{DC/2})/n_{0.10}}$; $s_{(DD_{AD/2}_{BD/2}_{CD/2})/n_{0.15}}$. n (number of observed animals) 271. Degrees of freedom (DF) were calculated according to the formula $k(k-1)/2$, where k is the number of alleles (39). $\chi^2_{(observed\ frequency_{expected\ frequency})^2/expected\ frequency}_{8.9}$; DF 6; P 0.20.

FIG. 2. *Nramp1* mRNA levels in monocytes from AA or BB animals. The expression level of *Nramp1* was measured before infection (time zero), and 6, 12, 24, and 48 h after *B. abortus* 2308 infection. Data are means ± standard deviations (error bars) of 10 AA and 10 BB subjects. Each subject was tested in triplicate in two independent experiments. Differences marked with one asterisk are significant (P 0.05); differences marked with two asterisks are highly significant (P 0.01).

TABELLA 2. La distribuzione di genotipo *Nramp1* fra le frequenze di genotipo di controllo degli animali sieronegativi ha osservato previsto (formula per frequenza prevista) Aa 68 68 (n_{p2}) ab 73 68 (n_{2pq}) ANNUNCIO di CA 21 27 (n_{2pr}) 42 41 (n_{2ps}) BB 13 17 (n_{q2}) BC 11 13 (n_{2qr}) BD 24 20 (n_{2qs}) cc 5 3 che (n_{r2}) il CD 11 8 (n_{2rs}) DD 3 6 (n_{s2}) ammonta a 271 271 una p, q, r e s indicano le frequenze osservate del *Nramp1A*, - B, - C e - alleli di D, rispettivamente. $p_{(aa_{AB/2}_{AC/2}_{AD/2})/n_{0.50}}$; $q_{(BB_{AB/2}_{BC/2}_{BD/2})/n_{0.25}}$; $r_{(cc_{AC/2}_{BC/2}_{DC/2})/n_{0.10}}$; $s_{(DD_{AD/2}_{BD/2}_{CD/2})/n_{0.15}}$. n (numero di animali osservati) 271. I gradi della libertà (DF) sono stati calcolati secondo la formula $K(k-1)/2$, dove K è il numero di alleli (39). $\chi^2_{(frequenza_{2/expected\ del\ \chi^2\ (frequenza\ prevista\ osservata\ di\ frequenza\)}_{8.9}}$; DF 6; P 0.20.

2. Livelli del mRNA *Nramp1* nei monocytes dagli animali di BB o di aa. Il livello di espressione di *Nramp1* è stato misurato prima dell'infezione (tempo zero) e 6, 12, 24 e 48 h dopo l'infezione dell'aborto 2308 del B. I dati sono scarti quadratici medi di mezzi ± (barre di errore) di 10 di BB 10 e di aa oggetti. Ogni oggetto è stato esaminato in triplice copia in due esperimenti indipendenti. Le differenze segnate con un asterisco sono significative (P 0.05); le differenze segnate con due asterischi sono altamente significative (P 0.01).

FIG. 3. Representative flow cytometry profiles of monocytes from AA and BB water buffaloes, noninfected and infected in vitro with *GFP-B. abortus*. (A) Noninfected (dashed line) and infected (solid line) AA monocytes. (B) Noninfected (dashed line) and infected (solid line) BB monocytes. For each sample, at least 2 × 10⁴ events were analyzed. The mean channels (calculated on 10 AA and 10 BB subjects, each tested twice in independent experiments) were 4 to 16 and 40 to 66, respectively. The mean channel of noninfected monocytes (AA or BB) was 2 to 3.

TABLE 3. *Nramp1* genotype distribution among brucellosis cases^a Genotype Frequencies of seropositive animals Observed Expected (formula for expected frequency)
AA 71 56 (n_{p2}) AB 24 23 (n_{2pq}) AC 2 18 (n_{2pr}) AD 10 27 (n_{2ps}) BB 0 2 (n_{q2}) BC 2 3 (n_{2qr}) BD 10 5 (n_{2qs}) CC 3 1 (n_{r2}) CD 17 4 (n_{2rs}) DD 3 3 (n_{s2})
Total 142 142 a p, q, r, and s indicate the observed frequencies of the *Nramp1A*, -B, -C, and -D alleles, respectively. $p_{(AA_{AB/2}_{AC/2}_{AD/2})/n_{0.63}}$; $q_{(BB_{AB/2}_{BC/2}_{BD/2})/n_{0.13}}$; $r_{(CC_{AC/2}_{BC/2}_{DC/2})/n_{0.10}}$; $s_{(DD_{AD/2}_{BD/2}_{CD/2})/n_{0.15}}$. n (number of observed animals) 142. Degrees of freedom (DF) were calculated according to the formula $k(k-1)/2$, where k is the number of alleles (39). $\chi^2_{(observed\ frequency_{expected\ frequency})^2/expected\ frequency}_{79.8}$; DF 6; P 0.001.

FIG. 4. Representative fluorescent microscopy profiles of AA and BB monocytes, noninfected or infected in vitro with *GFP-B. abortus* for 24 h and then stained with 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI). (A) Noninfected monocytes (AA and BB monocytes were indistinguishable). (B) Infected BB monocytes. (C) Infected AA monocytes. Left panel, cells analyzed with the 340-to-380-nm filter (DAPI). Central panel, cells analyzed with the 450-to-490-nm filter (GFP). Right panel, overlay; ×1,000 magnification and oil immersion. The experiment included 10 AA and 10 BB subjects, each tested twice in independent experiments.

3. Profili cytometry di flusso rappresentativo dei monocytes bufali dall'acqua di BB e di aa, non infetto ed infettato in vitro con GFP-B. aborto. (A) (Linea continua) monocytes non infetti (a linea tratteggiata) ed infettati di aa. (B) Non infetto (a linea tratteggiata) ed infettato (solido linea) monocytes di BB. Per ogni campione, almeno 2 \times 10⁴ eventi sono stati analizzati. Le scanalature medie (calcolate su 10 di BB 10 e di aa oggetti, ciascuno esaminato due volte negli esperimenti indipendenti) erano 4 - 16 e 40 - 66, rispettivamente. La scanalatura media dei monocytes non infetti (aa o BB) era 2 - 3.

TABELLA 3. La distribuzione di genotipo Nrampl fra le frequenze di genotipo di casesa di brucellosi degli animali sieropositivi ha osservato (formula per frequenza prevista) l'aa previsto 71 56 (n \times p²) l'ab 24 23 (n \times 2pq) ANNUNCIO di CA 2 18 (n \times 2pr) 10 27 (n \times 2ps) BB 0 2 (n \times q²) BC 2 3 (n \times 2qr) BD 10 5 (n \times 2qs) cc 3 1 (n \times r²) CD 17 4 (n \times 2rs) DD 3 3 (n \times s²) Il totale 142 142 una p, una q, una r e una s indica le frequenze osservate del NramplA, - B, - C e - alleli di D, rispettivamente. $p = (aa \times AB/2 + AC/2 + AD/2) / n = 0.63$; $q = (BB \times AB/2 + BC/2 + BD/2) / n = 0.13$; $r = (cc \times AC/2 + BC/2 + DC/2) / n = 0.10$; $s = (DD \times AD/2 + BD/2 + CD/2) / n = 0.15$. n (numero di animali osservati) = 142. I gradi della libertà (DF) sono stati calcolati secondo la formula $K(k-1) / 2$, dove K è il numero di alleli (39). $\chi^2 = \sum \{ \frac{(f_{osservata} - f_{previsto})^2}{f_{previsto}} \} = 79.8$ di frequenza); DF = 6; P = 0.001.

4. Profili fluorescenti rappresentativi di microscopia dei monocytes di BB e di aa, non infetto o infettato in vitro con GFP-B. aborto per 24 h ed allora macchiato con 4', 6-diamino-2-phenylindole (DAPI). (A) Monocytes non infetti (i monocytes di BB e di aa erano indistinguibili). (B) Infettato Monocytes di BB. (C) Monocytes infettati di aa. Pannello di sinistra, cellule analizzate con il filtro di 340 to-380-nm (DAPI). Il pannello centrale, cellule ha analizzato con il filtro di 450 to-490-nm (GFP). Pannello di destra, sovrapposizione; ingrandimento \times 1,000 e d'immersione in olio. L'esperimento ha incluso 10 aa e 10 BB gli oggetti, ciascuno hanno esaminato due volte negli esperimenti indipendenti.

FIG. 5. Viable and dead intracellular bacteria recovered from AA or BB monocytes. Cells were infected in vitro with *B. abortus* 2308, incubated for 12 to 48 h, and then lysed. Intracellular bacteria were stained (with SYTO9 and propidium iodide) and analyzed by flow cytometry. SYTO9 stains viable cells, and propidium iodide stains dead cells. The experiment included 10 AA and 10 BB subjects, each tested twice in independent experiments. (A) Viable (○) and dead (●) bacteria recovered from AA monocytes and viable (○) and dead (●) bacteria recovered from BB monocytes. (B) Percentages of viable and dead bacteria present in the AA monocytes. (C) Percentages of viable and dead bacteria present in the BB monocytes. Error bars indicate standard deviations.

TABLE 4. Reactive oxygen intermediates production in AA and BB subjects Samples Mean fluorescence channel for indicated genotype^a P_b AA BB Control^c 1.10 \pm 0.20 1.03 \pm 0.15 NS Noninfected 6.93 \pm 1.20 17.77 \pm 2.36 0.0209 Infected 28.67 \pm 4.04 83.67 \pm 6.66 0.0024 ^a Values are the means \pm standard deviations of 10 AA and 10 BB subjects, each tested twice in independent experiments. ^b P was calculated by Student's *t* test. NS, nonsignificant difference. ^c Control refers to cells not stained with DCF.

5. I batteri intracellulari possibili e guasti hanno recuperato dai monocytes di BB o di aa. Le cellule sono state infettate in vitro con l'aborto 2308 del B., hanno incubato per 12 a 48 h ed allora lysed. I batteri intracellulari sono stati macchiati (con lo ioduro di propidium e di SYTO9) e sono stati analizzati tramite flusso cytometry. SYTO9 macchia le cellule possibili e lo ioduro di propidium macchia le cellule guasti. L'esperimento ha incluso 10 aa e 10 oggetti di BB, ciascuno hanno esaminato due volte negli esperimenti indipendenti. (A) Possibile (○) ed i batteri guasti (del ●) hanno recuperato dai monocytes di aa e (○) dai batteri possibili (○) e guasti recuperati dai monocytes di BB. (B) Percentuali di possibile e batteri guasti presenti nei monocytes di aa. (C) Percentuali dei batteri possibili e guasti presenti nei monocytes di BB. Le barre di errore indicano gli scarti quadratici medi.

TABELLA 4. La produzione reattiva degli intermediari dell'ossigeno campioni che negli oggetti di BB e di aa la scanalatura media di fluorescenza per il P_b indicato

1'aa BB Controllc di genotypea 1.10 \pm 0.20 1.03 \pm 0.15 NS 6.93 \pm 1.20 17.77 \pm 2.36
 0.0209 non infetti ha infettato 28.67 \pm 4.04 83.67 \pm 6.66 0.0024 valori è gli
 scarti quadratici medi di mezzi \pm di 10 di BB 10 e di aa oggetti, ciascuno
 esaminato due volte negli esperimenti indipendenti. la b P è stata calcolata dalla
 prova di t dell'Student. NS, differenza non significativa. la c controlla si
 riferisce alle cellule non macchiate con DCF.

FIG. 6. Viable intracellular bacteria recovered from AA (○) or BB (■) monocytes at 12 to 48 h after infection with *B. abortus* 2308. Bacteria were counted by the CFU method. The double asterisk marks a highly significant difference ($P < 0.01$). The experiment included 10 AA and 10 BB subjects, each tested twice in independent experiments. Error bars indicate standard deviations.

FIG. 7. Micrographs of AA and BB monocytes 2 h postinfection with *B. abortus* 2308. (A) AA monocytes contain almost exclusively phagosomes with apposed walls. (B) BB monocytes contain numerous phagolysosomes (arrows) and display evident cell activation processes. Note the phagosome formation around a bacterium (arrowhead). Images are representative of differences observed between three AA and three BB subjects. Bar, 1 μ m.

TABLE 5. Reactive nitrogen intermediates production in AA and BB subjects^a Samples Reactive nitrogen intermediates (μ M) for indicated genotype *P*_b AA BB
 Noninfected 2.64 \pm 0.13 3.14 \pm 0.06 NS Infected 25.86 \pm 5.08 46.09 \pm 7.80 0.0363 ^a Figures are the means \pm standard deviations of 10 AA and 10 BB subjects, each tested twice in independent experiments. ^b *P* was calculated by Student's *t* test. NS, nonsignificant difference.

6. Batteri intracellulari possibili recuperati dall'aa (○) o monocytes di BB (■) a 12 a 48 h dopo l'infezione con l'aborto 2308 del B. I batteri sono stati contati con il metodo di CFU. L'asterisco del doppio contrassegna una differenza altamente significativa ($P < 0.01$). L'esperimento ha incluso 10 aa e 10 oggetti di BB, ciascuno hanno esaminato due volte negli esperimenti indipendenti. Le barre di errore indicano gli scarti quadratici medi.

7. Micrografi postinfection dei monocytes 2 h di BB e di aa con l'aborto 2308 del B. (A) I monocytes di aa contengono quasi esclusivamente i phagosomes con apposed le pareti. (B) I monocytes di BB contengono i phagolysosomes numerosi (frecce) e visualizzano i processi evidenti di attivazione delle cellule. Notare la formazione phagosome intorno ad un batterio (sagittaria). Le immagini sono rappresentante delle differenze osservate fra tre di BB tre e di aa oggetti. Barra, 1 μ m. TABELLA 5. La produzione reattiva degli intermediari dell'azoto intermediari reattivi dell'azoto dei campioni in subjectsa di BB e di aa (μ M) per il Pb indicato l'aa BB che di genotipo i 2.64 \pm 0.13 3.14 \pm 0.06 NS non infetto hanno infetto 25.86 \pm 5.08 46.09 \pm 7.80 0.0363 figure è gli scarti quadratici medi di mezzi \pm di 10 di BB 10 e di aa oggetti, ciascuno esaminato due volte negli esperimenti indipendenti. la b P è stata calcolata dalla prova di t dell'Student. NS, differenza non significativa.