

## Genetic Resistance to *Brucella abortus* in the Water Buffalo (*Bubalus bubalis*)

Giorgia Borriello,<sup>1</sup> Rosanna Capparelli,<sup>2</sup> Michele Bianco,<sup>3</sup> Domenico Fenizia,<sup>4</sup> Flora Alfano,<sup>4</sup> Federico Capuano,<sup>4</sup> Danilo Ercolini,<sup>2</sup> Antonio Parisi,<sup>5</sup> Sante Roperto,<sup>6</sup> and Domenico Iannelli<sup>1\*</sup>

Chair of Immunology,<sup>1</sup> Faculty of Biotechnological Sciences,<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale per il Mezzogiorno,<sup>4</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e Basilicata,<sup>5</sup> and Faculty of Veterinary Medicine,<sup>6</sup> University of Naples "Federico II," and Regione Campania, Assessorato all'Agricoltura,<sup>3</sup> Naples, Italy

Received 30 June 2005/Returned for modification 25 October 2005/Accepted 16 January 2006

**Brucellosis is a costly disease of water buffaloes (*Bubalus bubalis*). Latent infections and prolonged incubation of the pathogen limit the efficacy of programs based on the eradication of infected animals. We exploited genetic selection for disease resistance as an approach to the control of water buffalo brucellosis. We tested 231 water buffalo cows for the presence of anti-*Brucella abortus* antibodies (by the agglutination and complement fixation tests) and the *Nramp1* genotype (by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis). When the 231 animals (58 cases and 173 controls) were divided into infected (seropositive) and noninfected (seronegative) groups and the *Nramp1* genotypes were compared, the seropositive subjects were 52 out of 167 (31%) in the *Nramp1A* (*Nramp1AA* or *Nramp1AB*) group and 6 out of 64 (9.4%) in the *Nramp1A* (*Nramp1BB*) group (odds ratio, 4.37; 95% confidence limits, 1.87 to 10.19;  $\chi^2$ , 11.65 for 1 degree of freedom). Monocytes from *Nramp1BB* subjects displayed significantly ( $P < 0.01$ ) higher levels of *Nramp1* mRNA than *Nramp1AA* subjects and also a significantly ( $P < 0.01$ ) higher ability in controlling the intracellular replication of several *Brucella* species in vitro. Thus, selection for the *Nramp1BB* genotype can become a valuable tool for the control of water buffalo brucellosis in the areas where the disease is endemic.**

La brucellosi è una malattia costosa dei bufali d'acqua (*bubalis* di *Bubalus*). L'Infezioni è latente ad incubazione prolungata caratterizzata dal particolare agente patogeno per cui l'efficacia dei programmi di profilassi è basata su l'eliminazione (abbattimento) degli animali infetti. Abbiamo utilizzato la selezione genetica per valutare la resistenza alla malattia, come metodo utile al controllo della brucellosi del bufalo dell'acqua. Abbiamo esaminato in 231 bufale d'acqua la presenza di anticorpi anti-*Brucella abortus* (con l'agglutinazione e le prove di fissazione del complemento) e del genotipo *Nramp1* (tramite corsa elettroforetica del PCR-denaturante in gel). I 231 animali (58 in sperimentazione e 173 controlli) sono stati divisi in gruppi (sieronegativo) infetto (sieropositivo) non infetto e di questi sono stati confrontati i genotipi *Nramp1*, i soggetti sieropositivi erano 52 su 167 (31%) nel gruppo di *Nramp1A* (*Nramp1AA* o *Nramp1AB*) e 6 su 64 (9.4%) nel gruppo di *Nramp1A* (*Nramp1BB*) (rapporto di probabilità, 4.37; limiti di confidenza di 95%, 1.87 - 10.19;  $\chi^2$ , 11.65 per 1 grado di libertà). I Monocytes dei soggetti di *Nramp1BB* hanno mostrato significativamente ( $P < 0.01$ ) elevati livelli di mRNA *Nramp1* rispetto ai oggetti di *Nramp1AA* ed anche di a specializzazione significativa ( $P < 0.01$ ) la più alta nel controllo della replica intracellulare di parecchie specie della brucella in vitro. Quindi, la selezione per il genotipo di *Nramp1BB* può trasformarsi in uno strumento importante per il controllo di brucellosi del bufalo dell'acqua nelle zone dove la malattia è endemica.

The water buffalo (*Bubalus bubalis*) occupies an economically important place in the livestock industry in many parts of the world. One of these is the south of Italy. Brucellosis causes serious economic losses and is relevant also as a zoonosis (8).

The causative agent is *Brucella abortus*, a facultative intracellular pathogen which infects host macrophages. Only a few water buffalo cows that become infected develop clinical signs of the disease (spontaneous abortion). However, many infected cows shed *B. abortus* in the milk. Eradication programs involving the slaughter of infected animals have been carried out for more than 20 to 30 years. However, latent infections, prolonged incubation of the pathogen, incomplete protection provided by vaccines, and difficulties in distinguishing serologically between vaccinated and naturally infected animals have limited the efficacy of eradication programs. This paper exploits selective breeding for disease-resistant genotypes as a new approach to the control of water buffalo brucellosis. Remarkably, even in water buffalo herds heavily infected with *B. abortus*, about 20% of the subjects remain negative by the serological tests and presumably noninfected all the time.

This observation suggests that genetic variation within the host may play a part in the resistance to brucellosis. In cattle, it is known that the resistance to brucellosis is genetically determined (15, 38, 40). These circumstances, and the widespread presence of genes protecting against bacterial infections in livestock (15, 23, 30), humans (6, 25, 34, 43), mice (27, 36), and invertebrates (26, 29) prompted the search for polymorphisms conferring resistance to brucellosis in the water buffalo.

The *Nramp1* gene, first identified in the mouse (49), is a member of a large family of genes coding for metal ion-transporting proteins. Homologues of this gene are present in genetically distant organisms, such as mammals, insects, worms, plants, yeasts, and bacteria (11). The presence of *Nramp1* in bacteria and mammals has suggested that intracellular pathogens and host cells compete for the same nutrient, each competitor attempting to steal essential cations for its own benefit (18). The mouse *Nramp1* gene confers resistance to several unrelated intracellular pathogens, including *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Leishmania donovani*, and *Mycobacterium bovis* BCG (37, 44). The human *Nramp1* gene confers resistance to *Mycobacterium tuberculosis* (6), and the cattle *Nramp1* gene confers resistance to *Brucella abortus* (15). As to the mechanism by which *Nramp1* confers innate resistance to intracellular pathogens, it has been proposed that the product of *Nramp1* may limit microbial replication in the phagosome by subtracting critical nutrients to invading microbes (18).

Here it is shown that in the water buffalo, as in cattle, the resistance to *B. abortus* infection is associated with the gene *Nramp1*. The two alleles *Nramp1A* and *Nramp1B* (for brevity referred to as allele A and allele B) differ in the number of guanine and thymine (GT) microsatellites, the presence in the A allele of an insertion at position 17 and a point mutation at position 98. Animals homozygous for the B allele can control the replication of *B. abortus* inside the macrophages.

Il bufalo d'acqua (*bubalis* di *Bubalus*) occupa un posto economicamente importante nell'industria del bestiame in molte parti del mondo. Uno di questi è il sud Italia. La brucellosi causa perdite economiche serie ed è inoltre una zoonosi (8). L'agente causale è la brucella abortus, un agente patogeno intracellulare facoltativo che infetta i macrofagi dell'ospite. Le bufale allorché sono infettate sviluppano i segni clinici della malattia (aborto spontaneo). Tuttavia, alcune bufale infette dopo l'aborto eliminano Brucelle nel latte. I programmi di eradicazione che prevedono la macellazione degli animali infettati sono effettuati da più di 20 - 30 anni. Tuttavia, le infezioni latenti, incubazione prolungata dell'agente patogeno, protezione incompleta fornita dai vaccini e le difficoltà nella distinzione sierologica tra gli animali vaccinati e naturalmente infetti hanno limitato l'efficacia dei programmi di eradicazione. Questo lavoro sfrutta la selezione in allevamento per individuare i genotipi resistenti alla malattia, nuovo metodo utile al controllo della brucellosi del bufalo d'acqua. E' da rimarcare che nei branchi dei bufalo d'acqua infetti con la *B. abortus*, circa il 20% dei soggetti rimangono negativi dalle prove sierologiche e presumibilmente rimangono non infetti. Questa osservazione suggerisce che la variazione genetica all'interno dell'ospite favorisce la resistenza alla brucellosi. Negli animali è conosciuto che la resistenza alla brucellosi è determinata geneticamente (15, 38, 40). Queste circostanze e la presenza diffusa nel bestiame dei geni che proteggono dalle infezioni batteriche (15, 23, 30), in esseri umani (6, 25, 34, 43), in mouse (27, 36) ed in invertebrati (26, 29) hanno indirizzato la ricerca alla verifica della resistenza alla brucellosi nel bufalo d'acqua conferita dalla presenza di particolari polimorfismi genici. Il gene *Nramp1*, in primo luogo identificato nel mouse (49), è un membro di grande famiglia dei geni che codificano per le proteine di trasporto del metallo. Gli omologhi di questo gene sono presenti negli organismi geneticamente distanti, quali i mammiferi, in insetti, in viti, in piante, in lieviti ed in batteri (11). La presenza di *Nramp1* in batteri ed in mammiferi ha suggerito che gli agenti patogeni intracellulari e le cellule ospiti competono per la stessa sostanza nutriente, ogni competitore tenta di rubare i cationi essenziali per il relativo proprio beneficio (18). Il gene del mouse *Nramp1* conferisce resistenza a parecchi agenti patogeni intracellulari indipendenti, compreso il micobatterio bovis, la *Leishmania donovani* e la *Salmonella Typhimurium* (37, 44). Il gene umano *Nramp1* conferisce resistenza al micobatterio tubercolosi (6) ed il gene degli animali *Nramp1* conferisce resistenza all'aborto brucellare (15). Quanto al meccanismo da cui *Nramp1* conferisce resistenza innata agli agenti patogeni intracellulari, è stato proposto che il prodotto di *Nramp1* potesse limitare la replica microbica nel phagosome sottraendo le sostanze nutrienti critiche ai microbi invasori (18). Qui è dimostrato che nel bufalo dell'acqua, come nel bestiame, la resistenza all'infezione della *B. abortus* è associata con il gene *Nramp1*. I due alleli *Nramp1A* e *Nramp1B* (per brevità citata come allele A ed allele

B) differiscono nel numero di microsatellites di thymine e della guanina (GT), la presenza nell'allele di A di un'inserzione alla posizione 17 e una mutazione del punto alla posizione 98. Gli animali homozygoti per l'allele B possono controllare la replica della *B. abortus* all'interno dei macrofagi.

## MATERIALS AND METHODS

**Study design.** The inheritance of the A and B alleles was studied in 166 water buffaloes (the totality of the animals from an experimental herd with accurate \* 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](mailto:iannelli@unina.it). 2115 paternity records and located in the province of Salerno, Italy). This herd, free from brucellosis, was not included in the association study. For this purpose, the interest focused on two herds characterized by an exceptionally high incidence of brucellosis (up to 20% of the subjects were positive in the serological tests for brucellosis). The two herds are about 30 km distant, and both are located in the province of Caserta, Italy. The 231 water buffalo cows included in the study (age, 2 to 8 years) were chosen randomly among a total of about 500 present in the two herds. The 231 animals were all equally exposed to infection since birth and then were grown in one of the two infected herds. The animals that were positive by the agglutination and complement fixation tests at least twice within a 3-month period were classified as cases; the animals negative by the tests were classified as controls. Genotype analysis was carried out blindly (without knowing in advance the results from the serological tests). To avoid stratification (39), cases and controls contain equal proportions of animals (29 cases and 86 controls) from each herd. **PCR-DGGE analysis.** The *Nramp1* genotype of the subjects included in the present study was determined by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). DNA was phenol-chloroform extracted from venous blood as previously described (41). The 3' untranslated region (3'UTR) (nucleotide positions 1745 to 1955) of the water buffalo *Nramp1* gene was amplified using the forward primer 5' GTGGAATGAGTGGGCACAGT 3' and the reverse primer 5' CTCTCCGTCCTGCTGTGCAT 3' (22). A guanine-cytosine clamp was added to the forward primer (35). PCR was carried out in a Progene thermocycler (Techne, Cambridge, United Kingdom). The 50- $\mu$ l total reaction mixture contained 50 ng DNA, 1 $\times$  PCR buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9, 0.1% Triton X-100), 0.2 mM deoxynucleoside triphosphates, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM of each primer, and 2 U of *Taq* polymerase (Promega). The thermal profile included one cycle at 94°C for 2 min and 35 cycles at 94°C for 30 s, 53°C for 30 s, and 72°C for 30 s. The extension step was carried out at 72°C for 5 min. PCR products were electrophoresed through 8% polyacrylamide gels containing a 25 to 50% ureaformamide denaturing gradient using the Bio-Rad Dcode apparatus (Hercules, CA). After electrophoresis, the gels were stained in ethidium bromide solution for 5 min and then washed in distilled water for 20 min. Bands were visualized with the Gel Doc 2000 apparatus (Bio-Rad).

**Sequencing of the *Nramp1* alleles.** PCR products from three AA and three BB animals 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  $\mu$ m. The separation medium was the POP-4 polymer (Applied Biosystems). The sequence data were analyzed using GeneScan and Sequencing software (Applied Biosystems).

**DNA typing.** The DNAs from the 231 subjects included in the association study were genotyped with 11 microsatellite markers from the commercially available ABI "StockMarks" kit for cattle DNA typing (Applied Biosystems) using the procedure described by the supplier. The results were analyzed on an ABI model 310 automated DNA fragment analyzer. Of the 11 markers used, 2 (*SPS115* and *TGLA227*) provided unambiguous results with water buffalo samples.

***Nramp1* messenger level measurement.** Peripheral blood mononuclear cells were separated by gradient centrifugation (Lympholyte-Mammal; Cederlane, Hornby, Ontario, Canada). Total RNA was isolated by the Trizol reagent (Invitrogen, Milan, Italy). Synthesis of cDNA was carried out with the ImProm-II reverse transcriptase (Promega, Madison, WI). Amplification of the internal standard (the CD64 [Fc<sub>RI</sub>] gene) and of the target gene (*Nramp1*) was carried out under the following conditions: 3 min at 95°C, 40 cycles each of 15 s at 95°C, and then 45 s at 60°C. The primers were 5' GAGTACAATGGCATCTATC ACTG 3' (sense) and 5' AGAAGGATGTTCT CA GCACTGG 3' (antisense) for CD64 and 5' ACATTGAGTCGGATCTTCAGG 3' (sense) and 5' GGCC ACCTTAGGGTAGTAGAG 3' (antisense) for *Nramp1*. The sizes of the CD64 and *Nramp1* amplicons were 116 and 170 bp, respectively. The amplification mixture contained 12.5  $\mu$ l iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) and 1  $\mu$ M primers in a final volume of 25  $\mu$ l. Each experiment included as negative control a nontemplate reaction tube. Monocytes were infected in vitro with *B. abortus* 2308 (104 bacteria and 104 monocytes/well for 4 h).

MATERIALI E METODI, strumenti di studio. L'eredità degli alleli di B e di A è stata studiata in 166 bufali d'acqua (totalità degli animali da un gruppo sperimentale con citazione dell'autore corrispondente. Indirizzo spedente: Cattedra di Immunologia, degli Alimenti, Di Napoli "Federico del Dipartimento di Scienze Zootecniche e Ispezione di Studi di degli del `di Università II,, via il `di Università, 133, 80055, Portici, Napoli, Italia. Telefono: 39-081-2539277. Fax: 39-081-7762886. E-mail: [iannelli@unina.it](mailto:iannelli@unina.it). 2115 annotazioni di paternity e situato nella provincia di Salerno, dell'Italia). Questo branco, esente da brucellosi, non è stato incluso nello studio di associazione.

A questo fine, l'interesse ha messo a fuoco due gruppi caratterizzati da un'incidenza particolarmente alta di brucellosi (fino a 20% degli soggetti erano positivi nelle prove sierologiche per brucellosi). I due gruppi sono distanti circa 30 chilometri ed entrambi sono situati nella provincia di Caserta, Italia. I 231 bufali inclusi nello studio (2 - 8 anni di età,) è stata scelta a caso da un totale di circa di 500 animali presenti nei due greggi. I 231 animali erano tutti esposti ugualmente all'infezione dalla nascita e cresciuti nei greggi infetti. Gli animali che erano almeno due volte positivi dall'agglutinazione e dalle prove di fissazione di complemento durante un periodo di tre mesi sono stati classificati come casi; gli animali negativi dalle prove sono stati classificati come controlli. L'analisi di genotipo è stata effettuata ciecamente (senza conoscere in anticipo i risultati dalle prove sierologiche). Per evitare la stratificazione (39), i casi ed i controlli contengono le percentuali uguali di animali (29 casi e 86 comandi) da ogni gregge. Analisi di PCR-DGGE. Il genotipo Nramp1 degli oggetti inclusi nello studio presente è stato determinato tramite l'elettroforesi PCR-denaturante in gel (DGGE). Il DNA era fenolo-cloroformio estratto da sangue venoso come precedentemente descritto (41). 3 \_ la regione non tradotta (3\_UTR) (nucleotide posizione 1745 - 1955) del gene del bufalo Nramp1 dell'acqua è stata amplificata per mezzo dell'iniettore di andata 5 \_ GTGGAATGAGTGGGCACAGT 3 \_ e dell'iniettore d'inversione 5 \_ CTCTCCGTCTTGCTGTGCAT 3 \_ (22). Un morsetto della guanina-citosina è stato aggiunto all'iniettore di andata (35). PCR è stato effettuato in un thermocycler di Progene (Techne, Cambridge, Regno Unito). La miscela di reazione totale 50-<sub>1</sub> ha contenuto un DNA di 50 NG, 1 \_ amplificatore di PCR (50 millimetri di KCl, 10 millimetri Tris-HCl, pH 9, 0.1% Tritoni X-100), i trifosfati di deoxynucleoside di 0.2 millimetri, 1.5 millimetri di MgCl<sub>2</sub>, 0.4 millimetri di ogni iniettore e 2 U della polimerasi di Taq (Promega). Il profilo termico ha incluso un ciclo a 94°C per 2 minuti e 35 cicli a 94°C per 30 s, a 53°C per 30 s e a 72°C per 30 S. Il punto di estensione è stato effettuato a 72°C per 5 prodotti min. di PCR era electrophoresed attraverso i gel di poliacrilamide di 8% che contengono un ureaformamide di 50% - di 25 che denatura la pendenza per mezzo dell'apparecchiatura di Bio--Rad Dcode (Ercole, CA). Dopo l'elettroforesi, i gel sono stati macchiati nella soluzione del bromuro di etidio per 5 minuti ed allora lavato in acqua distillata per 20 fasce min. sono stati visualizzati con l'apparecchiatura del documento 2000 del gel (Bio--Rad). Ordinando degli alleli Nramp1. I prodotti di PCR da tre di BB tre e di aa animali sono stati ordinati 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 <sub>m</sub> 50. Il mezzo di separazione era POP-4 il polimero (biosistemi applicati). I dati di sequenza sono stati analizzati usando GeneScan ed ordinando il software in serie (biosistemi applicati). Battitura a macchina del DNA. Il DNAs dal 231 oggetto incluso nello studio di associazione era genotyped con 11 indicatore del microsatellite dal corredo disponibile nel commercio di ABI "StockMarks,, per il DNA dei bestiami che scrive (biosistemi applicati) seguendo la procedura descritta dal fornitore. I risultati sono stati analizzati su un analizzatore automatizzato del frammento del DNA del modello 310 di ABI. Del 11 indicatore usato, 2 (SPS115 e TGLA227) risultati inequivocabili forniti con i campioni del bufalo dell'acqua. Misura del livello del messaggero Nramp1. Le cellule mononucleari di anima periferica sono state separate tramite centrifugazione di pendenza (Lympholyte-Mammifero; Cederlane, Hornby, Ontario, il Canada). Il RNA totale è stato isolato dal reagente di Trizol (Invitrogen, Milano, Italia). La sintesi di cDNA è stata effettuata con il transcriptase d'inversione di ImProm-II (Promega, Madison, WI). L'amplificazione dello standard interno (il gene CD64 [Fc\_RI]) e del gene dell'obiettivo (Nramp1) è stata effettuata nelle seguenti circostanze: 3 minuti a 95°C, 40 cicli ciascuno di 15 s a 95°C ed allora 45 s a 60°C. Gli iniettori erano 5 \_ GAGTCACAATGGCATCTATC ACTG 3 \_ (senso) e 5 \_ AGAAGGATGTTCT IL CA GCACTGG 3 \_ (antisense) per CD64 e 5 \_ ACATTGAGTCGGATCTTCAGG 3

\_ (senso) e 5 \_ GGGC ACCTTAGGGTAGTAGAG 3 \_ (antisense) per *Nramp1*. I formati dei amplicons CD64 e *Nramp1* erano punto di ebollizione 116 e 170, rispettivamente. La miscela di amplificazione ha contenuto il quoziente d'intelligenza 12.5 del \_l SYBR Supermix verde (laboratori Bio--Rad, Ercole, CA) e gli iniettori del 1 \_M in un volume finale di \_l 25. Ogni esperimento incluso come controllo negativo un tubo di reazione del nontemplate. Monocytes were infected in vitro with *B. abortus* 2308 (104 bacteria and 104 monocytes/well for 4 h).

Relative expression levels were calculated by the comparative cycle threshold method (16). Each genotypic class included three animals. Each animal was tested in triplicate. Preliminary experiments showed that the internal standard (the CD64 gene) is not induced by the experimental conditions and is expressed at a level comparable with that of *Nramp1*.

**In vitro antibacterial activity of the *Nramp1* alleles.** Intracellular bacteria were counted as described previously (38). Briefly, peripheral blood mononuclear cells from seronegative AA, AB, or BB cows were separated by gradient centrifugation and infected with *B. abortus* 2308, *B. melitensis* biovar 1, biovar 2, biovar 3, or *B. suis* biovar 1 (approximately 104 cells and 104 bacteria/well), centrifuged at 750 \_g for 5 min, and incubated at 37°C (5% CO<sub>2</sub>) for 30 min. Extracellular bacteria were then killed by gentamicin (4 \_g/well). Cells were washed three times with Dulbecco's modified Eagle medium (to remove the antibiotic), fed on fresh medium, incubated for 18 h, and finally lysed with 0.5% Tween 20 (15 \_l/well). The content of each well was properly diluted with phosphate-buffered saline and plated on tryptose soy agar plates. The percentage of bacteria surviving at 18 h postchallenge was determined as described previously (38). Control wells were set up as described previously (38).

**Other procedures.** The serological tests for brucellosis were carried out by agglutination and complement fixation tests (3). *B. abortus* was isolated from vaginal swabs on blood agar (Oxoid, England, United Kingdom) and identified by PCR (14). The *P* value as predicted by the Fisher's exact test, and the odds ratio (OR) with 95% confidence intervals (CI) were calculated by using SPSS software (Chicago, IL).

**Nucleotide sequence accession numbers.** The nucleotide sequences of A and B alleles are available in the GenBank/DDBJ/EMBL databases under the accession numbers DQ095780 and DQ095781, respectively.

I livelli relativi di espressione sono stati calcolati con il metodo comparativo della soglia del ciclo (16). Ogni codice categoria genotipico ha incluso tre animali. Ogni animale è stato esaminato in triplice copia. Gli esperimenti preliminari hanno indicato che il campione interno (il gene CD64) non è indotto dalle circostanze sperimentali ed è espresso ad un livello paragonabile con quello di *Nramp1*. Attività antibatterica in vitro degli alleli *Nramp1*. I batteri intracellulari sono stati contati come descritti precedentemente (38). Brevemente, le cellule mononucleari di anima periferica dalle mucche sieronegative di aa, di ab, o di BB sono state separate tramite centrifugazione di pendenza ed infettato con l'aborto 2308 del B., il melitensis 1 biovar del B., 2, biovar biovar 3, o suis 1 biovar del B. (circa 104 cellule e 104 batteri/buoni), centrifugato a 750 \_g per 5 minuti ed incubato a 37°C (CO<sub>2</sub> di 5%) per 30 batteri extracellulari min. allora sono stati uccisi da gentamicina (4 \_g/well). Le cellule sono state lavate tre volte con il mezzo modificato dell'aquila del Dulbecco (per rimuovere l'antibiotico), fed sul mezzo fresco, sono state incubate per 18 h ed infine lysed con 0.5% Tween 20 (15 \_l/well). Il contenuto di ciascuno è stato diluito bene correttamente con salino tamponato con i fosfati ed è stato placcato sulle piastre di agar della soia del triptosio. La percentuale dei batteri che sopravvivono ad un postchallenge di 18 h è stata determinata come descritta precedentemente (38). I pozzi di controllo sono stati regolati su come descritti precedentemente (38). Altre procedure. Le prove sierologiche per brucellosi sono state effettuate dall'agglutinazione e dalle prove di fissazione di complemento (3). L'aborto del B. è stato isolato dai tamponi vaginali sull'agar di anima (Oxoid, Inghilterra, Regno Unito) ed è stato identificato da PCR (14). Il valore di P come previsto dalla prova esatta del pescatore ed il rapporto di probabilità (O) con gli intervalli di riservatezza di 95% (ci) sono stati calcolati usando il software di SPSS (Chicago, IL). Numeri di accessione di sequenza del nucleotide. Le sequenze del nucleotide degli alleli di B e di A sono disponibili nelle basi di dati di GenBank/DDBJ/EMBL sotto i numeri di accessione DQ095780 e DQ095781, rispettivamente.

## RESULTS

**Identification of the A and B alleles in the 3' untranslated region of the *Nramp1* gene.** The genomic DNA samples from 166 water buffaloes were analyzed for the presence of a dinucleotide repeat polymorphism in the 3' untranslated region (3' UTR) of the *Nramp1* gene. The analysis, carried out by DGGE, identified the A and the B variants. All tested animals displayed either the A or B variant or both; the phenotype characterized by the lack of both variants was absent (Fig. 1).

This pattern immediately suggested that the presence of the variants was regulated by two codominant alleles. Family data confirmed the proposed model of inheritance (data not shown). It was found that heterozygous animals could belong to either sex, thereby indicating that the *Nramp1* locus is not sex linked.

The frequencies of the alleles A and B, calculated on the genotype of 81 offspring, were 0.47 and 0.53, respectively. Sequence analysis displayed that the two alleles differ in the number of GT microsatellites (33 in the A allele and 36 in B) and the presence in the A allele of a GG insertion at position 17 and a point mutation (A versus G) at position 98. The A and B alleles are distinct from the alleles located in introns 4 and 5 and in exon V of the *Nramp1* gene described in different cattle and buffalo breeds (1).

**The B allele confers resistance to brucellosis.** We next examined the influence of the A and B alleles on the presence of antibodies against *B. abortus*, a strong indicator of infection following contact with the microbe. For this purpose, 231 animals were tested by the agglutination and complement fixation tests to detect the presence of anti-*B. abortus* antibodies and by DGGE to establish the *Nramp1* genotype. When the 231 animals were divided into infected (seropositive) and noninfected (seronegative) groups and the *Nramp1* genotypes were compared, the seropositive subjects were 52 out of 167 (31%) in the A\_ (AA or AB) group and 6 out of 64 (9.4%) in the A\_ (BB) group. Homozygosity for the B allele is thus significantly associated with resistance to *B. abortus* infection (OR, 4.37; 95% confidence limits, 1.87 to 10.19;  $\chi^2$ , 11.65 for 1 degree of freedom;  $P$  < 0.001). Records of serological tests for brucellosis relative to 21 water buffaloes demonstrate that BB animals remain seronegative in spite of prolonged exposure (up to 10 years) to *B. abortus*. The DNA from the 231 subjects included in the association study was analyzed for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium of allele frequencies between *B. abortus* infected and noninfected animals. The analysis included the candidate gene (*Nramp1*) and the two polymorphic loci *SPS115* and *TGLA227*. The latter represent the only polymorphic loci that were reproducibly detected using the cattle "StockMarks" kit. The *SPS115* and *TGLA227* loci did not display significant differences in genotype frequencies between infected (*SPS115*,  $\chi^2$  0.78; *TGLA227*,  $\chi^2$  2.34) and noninfected (*SPS115*,  $\chi^2$  1.82; *TGLA227*,  $\chi^2$  1.78) animals.

The genotypic distribution of the A and B alleles of the *Nramp1* gene displayed a highly significant ( $P$  0.012) departure from Hardy-Weinberg equilibrium when frequencies between infected and noninfected animals were compared (Table 1). Milk and vaginal mucus samples were collected at weekly intervals for 10 weeks from 10 BB-seronegative cows. One sample of milk and vaginal mucus also was collected from 10 seropositive AA or AB cows. *Brucella abortus* was isolated on blood agar and identified by PCR. Milk and vaginal mucus samples from the BB-seronegative cows were all negative. Milk and/or vaginal mucus samples from seven of the seropositive AA or AB cows were instead positive. PCR tests included as a control a milk and vaginal mucus sample from one of the AA or AB cows positive by the PCR test. The absence of *B. abortus* in the body fluids and of the corresponding antibodies in the blood of the BB-seronegative animals, if confirmed by more extensive experiments, will indicate that these animals do not carry the pathogen.

RISULTATI Identificazione degli alleli di B e di A \_ nella regione non tradotta 3' del gene *Nramp1*. I campioni genomic del DNA da 166 bufali dell'acqua sono stati analizzati per la presenza di un polimorfismo di ripetizione del dinucleotide 3' \_ nella regione non tradotta (3'UTR) del gene *Nramp1*. L'analisi, effettuata da DGGE, ha identificato A e le varianti di B. Tutti gli animali esaminati hanno visualizzato A o variante o entrambe di B; il fenotipo caratterizzato dalla mancanza di entrambe le varianti era assente (1). Questo modello immediatamente ha suggerito che la presenza delle varianti è stata regolata da due alleli codominant. I dati della famiglia hanno confermato il modello proposto dell'eredità (dati non indicati). È stato trovato che gli animali heterozygous potrebbero appartenere ad il uno o il altro sesso, quindi indicante che il luogo *Nramp1* non è sesso collegato. Le frequenze degli alleli A e B, calcolate sul genotipo di 81 prole, erano 0.47 e 0.53, rispettivamente. Analisi di sequenza visualizzata che i due alleli differiscono da nel numero di microsatellites di GT (33 nell'allele di A e 36 in B) e nella presenza nell'allele di A di un'inserzione di GG alla posizione 17 e ad una mutazione del punto (A contro il G) alla posizione 98. Gli alleli di B e di A sono distinti dagli alleli situati nei introns 4 e 5 e nel exon V del gene *Nramp1* descritto in bestiame e nelle razze differenti del bufalo (1). L'allele di B conferisce resistenza a brucellosi. Dopo abbiamo esaminato l'influenza degli alleli sulla presenza degli anticorpi contro l'aborto del B., un indicatore forte di B e di A del contatto seguente di infezione con il microbo. A questo fine, 231 animale

è stato esaminato dall'agglutinazione e dalle prove di fissazione di complemento per rilevare la presenza di anti-B. anticorpi dell'aborto e da DGGE per stabilire il genotipo *Nramp1*. Quando il 231 animale è stato diviso nell'infettato in (sieropositivo) ed i gruppi (sieronegativi) non infetti ed i genotipi *Nramp1* sono stati confrontati, gli oggetti sieropositivi erano 52 su 167 (31%) nel gruppo di A<sub>1</sub> (aa o ab) e 6 su 64 (9.4%) nel gruppo di A<sub>2</sub> (BB). Homozygosity per l'allele di B è associato così significativamente con resistenza all'infezione dell'aborto del B. ( $\chi^2$ , 4.37; limiti di confidenza di 95%, 1.87 - 10.19;  $\chi^2$ , 11.65 per 1 grado di libertà;  $P < 0.001$ ). Le annotazioni delle prove sierologiche per brucellosi riguardante 21 bufalo dell'acqua dimostrano che gli animali di BB rimangono sieronegativi nonostante esposizione prolungata (fino a 10 anni) all'aborto del B. Il DNA dal 231 oggetto incluso nello studio di associazione è stato analizzato per deviazione da equilibrio hardy-Weinberg delle frequenze dell'allele fra l'aborto del B. infettato e noninfected gli animali. L'analisi ha incluso il gene del candidato (*Nramp1*) ed i due luoghi polimorfici SPS115 e TGLA227. Il posteriore rappresenta gli unici luoghi polimorfici che reproducibly sono stati rilevati usando il corredo "di StockMarks," dei bestiami. I luoghi SPS115 e TGLA227 non hanno visualizzato le differenze significative nelle frequenze di genotipo fra infettato (SPS115,  $\chi^2$  0.78; TGLA227,  $\chi^2$  2.34) e non infetto (SPS115,  $\chi^2$  1.82; ) Animali TGLA227,  $\chi^2$  1.78. La distribuzione genotipica degli alleli di B e di A del gene *Nramp1* ha visualizzato ( $P = 0.012$ ) una partenza altamente significativa da equilibrio hardy-Weinberg quando le frequenze fra gli animali infettati e non infetti sono state confrontate (tabella 1). Il latte ed i campioni vaginali del muco sono stati raccolti a intervalli settimanali per 10 settimane da 10 mucche BB-sieronegative. Un campione di latte e di muco vaginale inoltre è stato raccolto da 10 mucche sieropositive di ab o di aa. L'aborto della brucella è stato isolato sull'agar di anima ed è stato identificato da PCR. Il latte ed i campioni vaginali dalle mucche BB-sieronegative erano tutto del muco negativi. Il latte e/o i campioni vaginali del muco da sette delle mucche sieropositive di ab o di aa erano preferibilmente positive. Le prove di PCR incluse come controllo un latte e un muco vaginale provano da una delle mucche di ab o di aa positive dalla prova di PCR. L'assenza dell'aborto del B. nei fluidi fisiologici e degli anticorpi corrispondenti nell'anima degli animali BB-sieronegativi, se confermato dagli esperimenti più vasti, indicherà che questi animali non trasportano l'agente patogeno.

**Level of the *Nramp1* mRNA in genetically resistant or susceptible animals.** Real-time reverse transcription-PCR did not display any significant difference in *Nramp1* expression between the AA, AB, and BB genotypes when the internal standard was the glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene (data not shown). The expression of housekeeping genes traditionally considered suitable internal standards (such as GAPDH) can vary considerably between cell types and can obscure differences in the expression level of the target gene (16, 48). When GAPDH was replaced with the CD64 (Fc<sub>RI</sub>) gene as an internal control, the BB animals displayed a significantly higher level of the *Nramp1* messenger (Fig. 2). No significant difference in the expression of *Nramp1* was observed between the AA and AB individuals, which are both susceptible to brucellosis.

***Nramp1*BB animals limit the growth in vitro of several *Brucella* species.** Water buffaloes can be infected by several *Brucella* species in addition to *B. abortus*. The BB subjects were therefore tested for their capacity to control the replication in vitro of *B. abortus*, *B. melitensis*, and *B. suis*. Monocytes from the BB animals displayed the ability to control the intracellular growth of the three *Brucella* species tested (Fig. 3). These results do not necessarily contradict the report in which *Nramp1* was found to be of limited efficacy in controlling *Brucella melitensis* in infected mice (19). The discrepancy in the results may reflect differences in the host (mice versus water buffalo) or between in vivo (19) and in vitro (this study) replication of *Brucella*. Infection of the BB animals with *Brucella* species was not carried forward, having been vetoed by the sanitary authority. The importance of the BB genotype for the natural resistance of water buffaloes to *B. melitensis* and *B. suis* therefore remains to be assessed.

Livello del mRNA *Nramp1* in animali geneticamente resistenti o suscettibili. La trascrizione-PCR d'inversione in tempo reale non ha visualizzato alcuna differenza significativa nell'espressione *Nramp1* fra i genotipi di aa, di ab e di BB quando il campione interno era il gene della deidrogenasi di glyceraldehydes-3-phosphate (GAPDH) (dati non indicati). L'espressione dei geni di governo della casa ha considerato tradizionalmente i campioni interni adatti (quale GAPDH) può variare considerevolmente fra i tipi delle cellule e può oscurare le differenze nel livello di espressione del gene dell'obiettivo (16, 48). Quando GAPDH è stato sostituito

con il gene CD64 (Fc<sub>RI</sub>) come controllo interno, gli animali di BB hanno visualizzato significativamente un di più alto livello del messaggero *Nramp1* (2). Nessuna differenza significativa nell'espressione di *Nramp1* è stata osservata fra gli individui di ab e di aa, che sono entrambe suscettibili di brucellosi. Gli animali di *Nramp1*BB limitano lo sviluppo in vitro di parecchie specie della brucella. I bufali dell'acqua possono essere infettati da parecchie specie della brucella oltre che l'aborto del B. Gli oggetti di BB quindi sono stati esaminati a loro capacità di controllare la replica in vitro dell'aborto del B., del melitensis del B. e dei suis del B. Monocytes dagli animali di BB ha visualizzato la capacità di controllare lo sviluppo intracellulare delle tre specie della brucella esaminate (3). Questi risultati necessariamente non contraddicono il rapporto in cui *Nramp1* sia stato trovato per essere di efficacia limitata in brucella melitensis di controllo in mouse infettati (19). La discrepanza nei risultati può riflettere le differenze in l'ospite (mouse contro il bufalo dell'acqua) o fra in vivo (19) e (la replica in vitro di questo studio) della brucella. L'infezione degli animali di BB con le specie della brucella non è stata trasportata in avanti, essendo vetoed dall'autorità sanitaria. L'importanza del genotipo di BB per la resistenza naturale dei bufali dell'acqua al melitensis del B. e ai suis del B. quindi rimane essere valutata.

## DISCUSSION

The search for alleles influencing susceptibility to pathogens is not new. One of the earliest examples (and certainly the best known) of these studies describes the protection of the human hemoglobin S allele from *Plasmodium falciparum* (2). In recent years, high throughput searches for polymorphisms yielded a large number of reports on the association of allelic variants with diseases. Unfortunately, many of these associations proved not to be reproducible (10, 24, 32). Criteria to attenuate the pitfalls afflicting these studies have been proposed (24, 28, 31). When carrying out genetic case-control studies, the biological plausibility of the candidate gene assumes primary importance. The association is likely to be meaningful (and reproducible) if there is evidence, from an animal model or a homologue gene, of a biological relation between trait and candidate gene (28). The association reported here certainly makes biological sense. The *Nramp1* gene in cattle is associated with resistance to *B. abortus* (15) and in the mouse with resistance to several intracellular bacteria that share with *B. abortus* the preference for an intracellular life (37, 44). More importantly, the resistance-associated allele of the bovine *Nramp1* gene, when expressed in stably transfected RAW264.7 macrophages, controls the in vitro replication of *B. abortus* (4).

In case-control studies, the proper selection of controls also assumes much value. A genetic heterogeneity between cases and controls, due to selection, recent admixture, or any other cause, may show up as disease association (10, 28); obviously, in this case the association would be artifactual. Analogously, if some of the control subjects have not been exposed to the pathogen, a true association may be missed, because unexposed subjects capable of becoming infected are included as controls (47). More intuitively, including in the control group subjects not exposed to infection is like trying to find malaria resistance genes in a sample of people living in an area free of mosquitoes. Thus, to prevent spurious associations, cases and controls need to be homogeneous for genetic composition and exposure to the pathogen. Cases and controls included in the present study fulfill the above requisites. The *SPS115* and *TGLA227* loci, each including four alleles, did not display a significant difference in genotype frequencies between the two groups. Second, both cases and controls are from farms where up to 20% of the subjects were seropositive by the test for brucellosis. Thus, exposure to *B. abortus* was sufficiently long for susceptible animals to become infected.

The majority of the BB subjects (58 out of 64) remain *B. abortus* antibody negative. Thus, the role of the water buffalo B allele in *B. abortus* infection reminds us of the human *CKR5* allele in human immunodeficiency virus (HIV) infection, where the individuals homozygous for *CKR5* are resistant to HIV infection and are HIV antibody negative (13). The absence of *B. abortus* antibodies in the majority of the BB animals is compatible with in vivo and in vitro studies showing that the NRAMP1 protein mediates resistance in the initial phase of infection (17). The role of the BB genotype in the containment of *B. abortus* infection is strengthened by the following observations. First, the frequency of the B allele is significantly higher in the control population ( $n = 173$ ) than in the case population ( $n = 58$ ) (0.44 versus 0.59; Fisher's exact test;  $P = 0.012$ ). Second, the BB animals remain seronegative even after prolonged exposure to the pathogen. Third, *B. abortus* was absent in the vaginal swabs collected weekly from 10 BB-seronegative cows over a 10-week period of time. Fourth, BB animals displayed higher levels of *Nramp1* mRNA and higher antibacterial activity than AA animals (Fig. 2 and 3).

La ricerca degli alleli che influenzano la predisposizione agli agenti patogeni non è nuova. Uno degli esempi più iniziali (e certamente del più noto) di questi studi descrive la protezione dell'allele umano dell'emoglobina S dal falciparum del Plasmodium (2). Negli ultimi anni, le alte ricerche di rendimento dei polimorfismi hanno reso tantissimi rapporti sull'associazione delle varianti allelic con le malattie. Purtroppo, molte di queste associazioni sono risultato non essere riproducibili (10, 24, 32). I test di verifica per attenuare i trabocchetti che

affliggono questi studi sono stati proposti (24, 28, 31). Nell'effettuare il casecontrol genetico studia, la plausibilità biologica del candidato che il gene assume importanza primaria. L'associazione è probabile essere espressiva (e riproducibile) se ci è prova, da un modello animale o da un gene omologo, di un rapporto biologico fra la caratteristica ed il gene del candidato (28). L'associazione ha segnalato qui certamente ha il significato biologico. Il gene *Nramp1* in bestiame è associato con resistenza all'aborto del B. (15) e nel mouse con resistenza a parecchi batteri intracellulari che ripartiscono con l'aborto del B. la preferenza per una vita intracellulare (37, 44). D'importanza, l'allele resistenza-collegato del gene del bovino *Nramp1*, una volta espresso dentro transfected stabile i macrofagi RAW264.7, controlla la replica in vitro dell'aborto del B. (4). Negli studi di contenitore-controllo, la selezione adeguata dei comandi inoltre presuppone molto valore. Un'eterogeneità genetica fra i casi ed i comandi, i dovuto la selezione, mescolanza recente, o tutta la altra causa, possono rivelare come associazione di malattia (10, 28); ovviamente, in questo caso l'associazione sarebbe artifactual. Analogamente, se alcuni degli oggetti di controllo non sono stati esposti all'agente patogeno, un'associazione allineare può essere mancata, perché gli oggetti non esposti capaci di essere infettati sono inclusi come comandi (47). Più intuitivo, includere negli oggetti del gruppo di controllo non esposti all'infezione è come provare a trovare i geni di resistenza di malaria in un campione della gente che vive esente in una zona dalle zanzare. Quindi, impedire le associazioni spurie, i casi ed i comandi devono essere omogenei per composizione ed esposizione genetica all'agente patogeno. I casi ed i comandi inclusi nello studio presente compiono i suddetti requisiti. SPS115 e TGLA227 i luoghi, ciascuno compreso quattro alleli, non hanno visualizzato una differenza significativa nelle frequenze di genotipo fra i due gruppi. In secondo luogo, sia i casi che i comandi provengono dai poderi in cui fino a 20% degli oggetti erano sieropositivi dalla prova per brucellosi. Quindi, l'esposizione all'aborto del B. era sufficiente lunga affinché gli animali suscettibili sia infettata. La maggior parte degli oggetti di BB (58 su 64) rimane negazione dell'anticorpo dell'aborto del B. Quindi, il ruolo dell'allele del bufalo B dell'acqua nell'infezione dell'aborto del B. ci ricorda dell'allele umano *CKR5* nell'infezione umana del virus di immunodeficiency (HIV), dove gli individui homozygous per *CKR5* sono resistenti all'infezione di HIV e sono negazione dell'anticorpo del HIV (13). L'assenza degli anticorpi dell'aborto del B. nella maggior parte degli animali di BB è compatibile con gli studi in vivo ed in vitro che indicano che la proteina *NRAMP1* media la resistenza nella fase iniziale dell'infezione (17). Il ruolo del genotipo di BB nel contenimento dell'infezione dell'aborto del B. è rinforzato tramite le seguenti osservazioni. In primo luogo, la frequenza dell'allele di B è significativamente più alta nella popolazione di controllo (n 173) che nella popolazione di caso (n 58) (0.44 contro 0.59; Prova esatta del pescatore; P 0.012). In secondo luogo, gli animali di BB rimangono sieronegativi anche dopo esposizione prolungata all'agente patogeno. In terzo luogo, l'aborto del B. era assente nei tamponi vaginali ha raccolto settimanalmente da 10 mucche BB-sieronegative su un periodo di dieci settimane di tempo. Il quarto, animali di BB ha visualizzato i livelli elevati di mRNA *Nramp1* e l'più alta attività antibatterica che gli animali di aa (2 e 3).

A minority (6 out of 64) of the BB animals were found to be weakly positive by the serological test of brucellosis (antibody titer, 20 to 40 IU). These animals were culled immediately. We therefore can only speculate on what might have caused this result. One explanation is that the six subjects, following a recent infection with *B. abortus*, mounted a successful immune response and killed the pathogen. Accordingly, the antibodies detected by the serological test were only transient. Two lines of evidence support this interpretation. The first is that the same subjects in the course of previous screens for brucellosis were found repeatedly seronegative. The second is that cattle resistant to the brucellosis, when challenged with live *B. abortus* 2308, develop low transient antibody titers (38). Alternative explanations are that a new strain of *B. abortus* able to infect the BB animals is emerging in the population; stressful circumstances or a particular route of infection increased the vulnerability of these animals to brucellosis.

The possibility that the association described in this study is due to a gene in linkage disequilibrium with *Nramp1* cannot be formally dismissed. However, the biological congruence between candidate gene and trait (discussed above) strongly suggests that *Nramp1* is the gene or, more likely, one of the genes (21) conferring resistance to *B. abortus* infection. Several studies (4, 7) have described the molecular basis of the association between the *Nramp1* gene and diseases. These studies provide support to speculate how this gene

might influence the resistance to brucellosis in water buffaloes as well. The microsatellite polymorphism in the promoter region of the human *Nramp1* gene (42) controls the resistance to tuberculosis by regulating the level of the NRAMP1 protein: the allele promoting a high level of the protein (allele 3) confers resistance to tuberculosis, and the allele promoting a low level of the same protein (allele 2) confers susceptibility (7). The microsatellite polymorphisms in the 3'UTR region of human (9) and cattle (4) *Nramp1* genes influence disease predisposition by the same mechanism. Based upon the above evidence and the results reported in Fig. 2, we suggest that the microsatellite polymorphism identified in the 3'UTR region of the water buffalo *Nramp1* gene shapes susceptibility or resistance to *B. abortus* by determining a low (in the presence of one or two copies of the A allele) or high (in the presence of two copies of the B allele) level of the NRAMP1 protein.

Una minoranza (6 su 64) degli animali di BB è stata trovata per essere debolmente positive dalla prova sierologica di brucellosi (IU di titolo dell'anticorpo 20 - 40,). Questi animali si sono raccolti immediatamente. Quindi possiamo speculare soltanto su che cosa potrebbe causare questo risultato. Una spiegazione è che i sei oggetti, seguenti un'infezione recente con l'aborto del B., hanno montato una risposta immunitaria riuscita ed hanno ucciso l'agente patogeno. Di conseguenza, gli anticorpi rilevati dalla prova sierologica erano soltanto transitori. Due linee di prova sostengono questa interpretazione. Il primo è che i medesimi argomenti nel corso degli schermi precedenti per brucellosi sono stati trovati ripetutamente sieronegativi. Il secondo è che i bestiami resistenti alla brucellosi, una volta sfidati con l'aborto in tensione 2308 del B., sviluppano i titoli transitori bassi dell'anticorpo (38). Le spiegazioni alternative sono che un nuovo sforzo dell'aborto del B. in grado di infettare gli animali di BB sta emergendo nella popolazione; le circostanze stressanti o un itinerario particolare dell'infezione hanno aumentato la vulnerabilità di questi animali a brucellosi. La possibilità che l'associazione descritta in questo studio è dovuto un gene nello squilibrio del collegamento con *Nramp1* non può essere allontanata formalmente. Tuttavia, la congruenza biologica fra il gene del candidato e la caratteristica (discussi sopra) suggerisce fortemente che *Nramp1* è il gene o, più probabile, quello della 21) resistenza di conferimento dei geni (all'infezione dell'aborto del B. Parecchi studi (4, 7) hanno descritto la base molecolare dell'associazione fra il gene *Nramp1* e le malattie. Questi studi forniscono il supporto per speculare come questo gene potrebbe influenzare la resistenza a brucellosi nei bufali dell'acqua pure. Il polimorfismo del microsatellite nella regione del promotore *Nramp1* del gene umano (42) controlla la resistenza alla tubercolosi regolando il livello della proteina NRAMP1: l'allele che promuove un ad alto livello della proteina (allele 3) conferisce resistenza alla tubercolosi e l'allele che promuove un basso livello della stessa proteina (allele 2) conferisce predisposizione (7). I polimorfismi del microsatellite nella regione 3'UTR dei geni 4) *Nramp1* dell'essere umano (9) e dei bestiami (influenzano il predisposition di malattia dallo stesso meccanismo. Basato sulla suddetta prova e sui risultati ha segnalato in 2, suggeriamo che il polimorfismo del microsatellite identificato nella regione 3'UTR del gene del bufalo *Nramp1* dell'acqua modella la predisposizione o la resistenza all'aborto del B. determinando un basso (in presenza di una o due copia dell'allele di A) o (in presenza di due copie dell'allele di B) livello elevato della proteina NRAMP1.

The persistence in water buffaloes of the A allele causing susceptibility to a diffuse pathogen (*B. abortus*) is enigmatic. Why has it not been eliminated by natural selection? The alleles 2 and 3 of the human *Nramp1* gene are maintained by balanced polymorphism. Allele 3 protects against infectious diseases but predisposes to autoimmune diseases; allele 2 protects against autoimmune diseases but predisposes to the infectious ones (7). This result has been replicated in numerous independent studies (7). On the basis of this evidence, we suggest balanced polymorphism as the mechanism probably maintaining the A and B alleles in the water buffalo. It is interesting to note that the examples of balanced polymorphism so far known are all associated with resistance to infectious diseases: the HbS variant of haemoglobin (12), the loci controlling the leukocyte antigens (HLA) in humans (20), glucose- 6-phosphate dehydrogenase (46), NRAMP1 (6), and the prion protein (33).

The present study was undertaken to test the validity of a selection program for resistance to brucellosis in the water buffalo. We would like therefore to comment on what might be the results of this program. We cannot exclude that water buffaloes selected for resistance to the existing strains of *B. abortus* in the future might test susceptible to new strains of the same pathogen. A warning comes from sheep that are genetically resistant to the known strains of scrapie but that are susceptible to new strains (5). While the possibility that the good gene of today may become the bad gene of tomorrow cannot be excluded, selection for resistance still remains the most suitable strategy to temper the host-pathogen interaction. The rapid elimination of the subjects susceptible to the newly emerging *B. abortus* strains would

delay bacterial evolution by continually imposing on the pathogen new attack strategies (50). Disease resistance is a trait shaped by tradeoffs with other fitness components (50). Host resistance to brucellosis may therefore carry a fitness cost in the form of, for example, reduced fertility, reduced milk production, or increased susceptibility to other diseases. This outcome, while undesirable, would not compromise irreparably plans for a selection program.

It is possible, in fact, to combine selection for traits displaying a negative genetic correlation (45). Finally, the minority of BB hosts displaying anti-*B. abortus* antibodies, if they really are susceptible, would not represent a limit to the project, since they would be protected by the herd immunity.

In conclusion, we have detected in water buffalo a correlation between the BB genotype and resistance to *B. abortus* infection. Genetic selection as a means to increase the resistance to brucellosis therefore seems a reasonable approach.

The selective breeding of BB males will spread rapidly the allele conferring resistance while conserving the gene pool of the herds.

La persistenza nei bufali dell'acqua dell'allele di A che causa la predisposizione ad un agente patogeno diffuso (aborto del B.) è enigmatica. Perché è stata eliminata tramite la selezione naturale? Gli alleli 2 e 3 del gene umano *Nramp1* sono effettuati dal polimorfismo equilibrato. L'allele 3 protegge dalle malattie contagiose ma predispone alle malattie autoimmuni; l'allele 2 protegge dalle malattie autoimmuni ma predispone a quelle contagiose (7). Questo risultato è stato ripiegato negli studi indipendenti numerosi (7). In base a questa prova, suggeriamo il polimorfismo equilibrato come il meccanismo probabilmente che effettuiamo gli alleli di B e di A nel bufalo dell'acqua. È interessante notare che gli esempi del polimorfismo equilibrato finora conosciuti sono tutti connessi con resistenza alle malattie contagiose: la variante di HbS di emoglobina (12), i luoghi che controllano gli antigeni del leucocita (HLA) in esseri umani (20), deidrogenasi del fosfato del glucosio 6 (46), *NRAMP1* (6) e la proteina di prion (33). Lo studio presente è stato intrapreso per verificare la validità di un programma di selezione per resistenza a brucellosi nel bufalo dell'acqua. Vorremmo quindi commentare che cosa potrebbe essere i risultati di questo programma. Non possiamo escludere che i bufali dell'acqua selezionati per resistenza agli sforzi attuali dell'aborto del B. in avvenire potrebbero esaminare suscettibile di nuovi sforzi dello stesso agente patogeno. Un avvertimento viene dalle pecore che sono geneticamente resistenti agli sforzi conosciuti di scrapie ma che essere suscettibile di nuovi sforzi (5). Mentre la possibilità che il buon gene dell'oggi può trasformarsi in nel gene difettoso del domani non può essere esclusa, la selezione per resistenza ancora rimane la strategia più adatta per temperare l'interazione dell'ospite-agente patogeno. L'eliminazione veloce degli oggetti suscettibili degli sforzi recentemente d'emersione dell'aborto del B. farebbe ritardare lo sviluppo batterico continuamente imponendo alle nuove strategie di attacco dell'agente patogeno (50). La resistenza di malattia è una caratteristica a forma di dalle alternanze con altri componenti di idoneità (50). La resistenza ospite a brucellosi può quindi trasportare una idoneità costata sotto forma di, per esempio, fertilità ridotta, produzione di latte ridotta, o predisposizione aumentata ad altre malattie. Questo risultato, mentre indesiderabile, non comprometterebbe irreparably i programmi per un programma di selezione. È possibile, infatti, unire la selezione per le caratteristiche che visualizzano una correlazione genetica negativa (45). Per concludere, la minoranza di BB ospita la visualizzazione del anti-B. gli anticorpi dell'aborto, se realmente sono suscettibili, non rappresenterebbero un limite al progetto, poiché sarebbero protetti dall'immunità del gregge. In conclusione, abbiamo rilevato nel bufalo dell'acqua una correlazione fra il genotipo di BB e la resistenza all'infezione dell'aborto del B. La selezione genetica come mezzi per aumentare la resistenza a brucellosi quindi sembra un metodo ragionevole. L'allevamento selettivo dei maschi di BB spargerà velocemente la resistenza di conferimento dell'allele mentre conserva il gruppo di gene le greggi.

#### 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. Allison, A. C. 1954. Protection afforded by the sickle-cell trait against subtertian malarial infection. *Br. Med. J.* **1**:290-294.
3. Alton, G. G., W. M. Jones, and D. E. Pietz. 1975. Laboratory techniques in brucellosis, p. 64-124. WHO monograph series 55. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
4. Barthel, R., J. Feng, J. A. Piedrahita, D. N. McMurray, J. W. Templeton, and L. G. Adams. 2001. Stable transfection of the bovine *NRAMP1* gene into murine RAW264.7 cells: effects on *Brucella abortus* survival. *Infect. Immun.* **69**:3110-3119.

5. Baylis, M., and K. M. McIntyre. 2004. Scrapie control under new strain. *Nature* **432**:810–811.
6. Bellamy, R., C. Ruwende, T. Corrah, K. P. McAdam, H. Whittle, and A. V. Hill. 1998. Variations in the *NRAMP1* gene and susceptibility to tuberculosis in West Africa. *N. Engl. J. Med.* **338**:640–644.
7. Blackwell, J. M., S. Searle, H. Mohamed, and J. K. White. 2003. Divalent cation transport and susceptibility to infectious and autoimmune disease: continuation of the *lty/Lsh/Nramp1/Slc11a1* gene story. *Immunol. Lett.* **85**: 197–203.
8. Boschirolu, M., V. Foulongne, and D. O'Callaghan. 2001. Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**:58–64.
9. Buu, N. T., M. Cellier, P. Gros, and E. Schurr. 1995. Identification of a highly polymorphic length variant in the 3'UTR of NRAMP1. *Immunogenetics* **42**:428–429.
10. Cardon, L. R., and J. I. Bell. 2001. Association study designs for complex diseases. *Nat. Rev. Genet.* **2**:91–99.
11. Cellier, M., A. Belouchi, and P. Gros. 1996. Resistance to intracellular infections: comparative genomic analysis of *Nramp*. *Trends Genet.* **12**:201–205.
12. Cooke, G. S., and A. V. Hill. 2001. Genetics of the susceptibility to human infectious disease. *Nat. Rev. Genet.* **2**:967–977.
13. Dean, M., M. Carrington, C. Winkler, G. A. Hutley, M. Smith, R. Allikmets, J. J. Goedet, S. P. Buchbinder, E. Vittinghoff, E. E. Gompert, S. Donfils, 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. Ewald, D. R., and B. J. Bricker. 2000. Validation of the abbreviated *Brucella* AMOS PCR as a rapid screening method for differentiation of *Brucella abortus* field strain isolates and vaccine strains, 19 and RB51. *J. Clin. Microbiol.* **38**:3085–3086.
15. Feng, J., Y. Li, M. Hashad, M. Schurr, P. Gros, L. G. Adams, and J. W. Templeton. 1996. Bovine natural resistance associated macrophage protein 1 (*Nramp1*) gene. *Genome Res.* **6**:956–964.
16. Garcia-Crespo, D., R. A. Juste, and A. Hurtado. 2005. Selection of ovine housekeeping genes for normalization by real-time RT-PCR; analysis of PrP gene expression and genetic susceptibility to scrapie. *BMC Vet. Res.* doi: 10.1186/1746-6148-1-3.
17. Gros, P., E. Skamene, and A. Forget. 1983. Cellular mechanisms of genetically controlled host resistance to *Mycobacterium bovis* (BCG). *J. Immunol.* **131**:1966–1972.
18. Gruenheid, S., and P. Gros. 2000. Genetic susceptibility to intracellular infections: *Nramp1*, macrophage function and divalent cations transport. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**:43–48.
19. Guilloteau, L. A., J. Dornand, A. Gross, M. Olivier, F. Cortade, Y. Le Vern, and D. Kerboeuf. 2003. *Nramp1* is not a major determinant in the gene control of *Brucella melitensis* infection in mice. *Infect. Immun.* **71**:621–628.
20. Hill, A. V., J. Elvin, A. C. Willis, M. Aidoo, C. E. Allsopp, F. M. Gotch, X. M. Gao, M. Takiguchis, B. M. Greenwood, A. R. Townsend, A. J. McMichael, and H. C. Whittle. 1992. Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria. *Nature* **360**:434–439.
21. Ho, M., and C. Cheers. 1982. Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection. IV. Genetic and cellular basis of resistance to chronic infection with *Brucella abortus*. *J. Infect. Dis.* **146**:381–387.
22. 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.
23. Hu, J., N. Bumstead, P. Barrow, G. Sebastiani, L. Olien, K. Morgan, and D. Malo. 1997. Resistance to salmonellosis in the chicken is linked to *NRAMP1* and *TNC*. *Genome Res.* **7**:693–704.
24. Ioannidis, J. P., E. E. Ntzani, T. A. Trikalinos, and D. G. Contopoulos-Ioannidis. 2001. Replication validity of genetic association studies. *Nat. Genet.* **29**:306–309.
25. Jang, Z. D., P. C. Okhuysen, D. C. Guo, R. He, T. M. King, H. DuPont, and M. Milewicz. 2003. Genetic susceptibility to enteroaggressive *Escherichia coli* diarrhoea: polymorphism in the interleukin-8 promoter region. *J. Infect. Dis.* **188**:506–511.
26. Khush, R. S., F. Leulier, and B. Lemaitre. 2002. Pathogen surveillance – the flies have it. *Science* **296**:273–275.
27. Kramnick, I., W. F. Dietrich, P. Dermant, and B. R. Bloom. 2000. Genetic control of resistance to experimental infection with virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:8560–8565.
28. Lander, E. S., and N. Schork. 1994. Genetic dissection of complex traits. *Science* **265**:2037–2048.
29. Lazzaro, B. P., B. K. Scurman, and A. G. Clark. 2004. Genetic basis of natural variation in *D. melanogaster* antibacterial immunity. *Science* **303**: 1873–1876.
30. Lessard, M., D. L. Hutchings, and J. L. Spencer. 1995. Cell-mediated and humoral immune responses in chicken infected with *Salmonella typhimurium*. *Avian Dis.* **39**:230–238.
31. 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 diseases. *Nat. Genet.* **33**:177–182.
32. Lucentini, J. 2004. Gene association studies typically wrong. *Scientist* **18**:20.
33. Mead, S., M. P. Stumpf, J. Whitfield, J. A. Beck, M. Poulter, T. Campbell, J. B. Uphill, D. Goldstein, M. Alpers, E. M. Fisher, and J. Collinge. 2003. Balancing selection at the prion protein gene consistent with prehistoric kurulike epidemics. *Science* **300**:640–643.
34. Mira, M. T., A. Alcais, V. T. Nguyen, M. O. Moraes, C. Di Flumeri, H. T. Vu, C. P. Mai, T. H. Nguyen, N. B. Nguyen, P. Khoa, E. Sarno, A. Alter, A. Montpetit, A. M. Moraes, J. Moraes, C. Dore, C. Gallant, P. Lepage, A. Verner, E. van de Vesse, T. Hudson, L. Abet, and E. Schurr. 2004. Susceptibility to leprosy is associated with *PARK2* and *PACRG*. *Nature* **427**:636–640.
35. Muyzer, G. E., C. De Waal, and A. G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:695–700.
36. O'Brien, A. D., D. L. Rosenstreich, I. Scher, G. H. Campbell, and R. P. MacDermott. 1980. Genetic control of susceptibility to *Salmonella typhimurium* infection in mice: role of the *Lps* gene. *J. Immunol.* **124**:20–22.
37. Plant, J. E., J. M. Blackwell, A. D. O'Brien, D. J. Bradley, and A. A. Glynn. 1982. Are the *Lsh* and *lty* disease resistance genes at one locus on mouse chromosome 1? *Nature* **297**:510–511.
38. Price, R. E., J. W. Templeton, R. Smith III, and L. G. Adams. 1990. Ability of mononuclear phagocytes from cattle naturally resistant or susceptible to brucellosis to control in vitro intracellular survival of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* **58**:879–886.
39. 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.
40. Qureshi, T., J. W. Templeton, and L. G. Adams. 1996. Intracellular survival of *Brucella abortus*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Salmonella* serovar *Dublin*, and *Salmonella typhimurium* in macrophages from cattle genetically resistant to *Brucella abortus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **50**:55–65.
41. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1998. Appendix E: commonly used techniques in molecular cloning, p. E3–E4. *In* N. Irwin, N. Ford, and C. Nolan (ed.), *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
42. Searle, S., and J. M. Blackwell. 1999. Evidence for a functional repeat polymorphism in the promoter of the human *NRAMP1* gene that correlates with autoimmune versus infectious disease susceptibility. *J. Med. Genet.* **36**:295–299.
43. Segal, S., and A. V. Hill. 2003. Genetic susceptibility to infectious disease. *Trends Microbiol.* **11**:445–448.
44. Skamene, E., P. Gros, A. Forget, P. A. Kongshavn, C. St-Charles, and B. A. Taylor. 1982. Genetic regulation of resistance to intracellular pathogens. *Nature* **297**:506–509.
45. Stear, M. J., S. C. Bishop, B. A. Mallard, and H. Raadsma. 2001. The sustainability, feasibility and desirability of breeding livestock for disease control. *Res. Vet. Sci.* **71**:1–7.
46. Tishkoff, S., R. Varkonyi, N. Cahinhan, S. A. Argyropoulos, G. Destro-Bisol, A. Drosiotou, B. Dangerfield, G. Lefranc, J. Loiselet, A. Piro, M. Stoneking, A. Tagarelli, G. Tagarelli, E. H. Touma, S. M. Williams, and A. G. Clark. 2001. Haplotype diversity and linkage disequilibrium at human *G6PD*: recent origin of alleles that confer malarial resistance. *Science* **293**: 455–462.
47. Thio, C. L., D. L. Thomas, and M. Carrington. 2000. Chronic viral hepatitis and the human genome. *Hepatology* **31**:819–827.
48. Warrington, J. A., A. Nair, M. Mahadevappa, and M. Tsyganskaya. 2000. Comparison of human adult and fetal expression and identification of 535 housekeeping/maintenance genes. *Physiol. Genomics* **2**:143–147.
49. Vidal, S. M., D. Malo, K. Vogan, E. Skamene, and P. Gros. 1993. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate gene for *Bcg*. *Cell* **73**:469–485.
50. Woolhouse, M. E., J. P. Webster, E. Domingo, B. Charlesworth, and B. R. Lewin. 2002. Biological and biomedical implications of the co-evolution of pathogens and their hosts. *Nat. Genet.* **32**:569–577.

Editor: V. J. DiRita

FIG. 1. Representative DGGE profiles of *Nramp1AA* (lanes 7 and 9), *Nramp1AB* (lanes 1, 3, 8, and 10), and *Nramp1BB* (lanes 2, 4, 5, and 6) water buffalo genotypes.

TABLE 1. Evaluation of Hardy-Weinberg equilibrium in the frequencies of *Nramp1A* and *Nramp1B* alleles in water buffaloes infected with *B. abortus* and left noninfected<sup>a</sup> Subject No. of buffaloes for genotype: Gene frequency  $\chi^2$  P AA AB BB Total A B Infected 13 (18.2) 39 (28.6) 6 (11.2) 58 0.56 0.44 7.68 0.021 Noninfected 28 (29.08) 87 (83.7) 58 (60.22) 173 0.41 0.59 0.25 0.882 <sup>a</sup> Figures in parentheses refer to the expected number of subjects in each class. The frequency of the B allele in the infected and noninfected subjects is significantly different ( $P = 0.012$ ).

FIG. 2. *Nramp1* relative expression levels in monocytes from AA, AB, and BB monocytes, noninfected and infected (4 h) with *Brucella abortus* 2308. The CD64 gene was used as an internal standard. Relative expression levels were calculated by the comparative cyclic threshold method (16). Each genotypic class includes three animals, each animal tested in triplicate. *Nramp1* expression level in BB-induced monocytes is significantly different ( $P < 0.01$ ) from the level in BB noninduced monocytes and from the levels in AA and AB monocytes, induced and noninduced. *Nramp1* expression level in BB noninduced monocytes is significantly different ( $P < 0.05$ ) from the levels in AA and AB monocytes, induced and noninduced. FIG. 3. Ability of AA and BB subjects to control the intracellular replication of *Brucella* species. Each genotypic class includes three animals, each animal tested in triplicate. Intracellular bacteria were counted 18 h postinfection. Differences in intracellular survival between AA and BB subjects are all significantly different ( $P < 0.01$ ). B. mel 1, *B. melitensis* serovar 1; B. mel 2, *B. melitensis* serovar 2; B. mel 3, *B. melitensis* serovar 3.

VOL. 74, 2006 INNATE IMMUNITY TO *BRUCELLA ABORTUS* 2117

1. Profili rappresentativi di DGGE genotipi del bufalo dell'acqua di *Nramp1AA* (vicoli 7 e 9), di *Nramp1AB* (vicoli 1, 3, 8 e 10) e di *Nramp1BB* (vicoli 2, 4, 5 e 6). TABELLA 1. La valutazione di equilibrio hardy-Weinberg nelle frequenze degli alleli di *Nramp1B* e di *Nramp1A* nei bufali dell'acqua infettati con l'aborto del B. e il noninfettata di sinistra sottopone no dei bufali per il genotipo: Il totale di frequenza  $\chi^2$  la P L'aa L'ab BB del gene una B ha infettato 13 (18.2) 39 (28.6) 6 (11.2) 58 0.56 0.44 7.68 0.021 28 (29.08) 87 (83.7) 58 (60.22) 173 0.41 0.59 0.25 0.882 non infetti figure tra parentesi si riferisce al numero previsto di oggetti in ogni codice categoria. La frequenza dell'allele di B negli individui infettati e non infetti è significativamente differente ( $P = 0.012$ ).

2. Livelli relativi di espressione *Nramp1* nei monocytes dai monocytes di aa, di ab e di BB, non infetto ed infettato (4 h) con l'aborto 2308 della brucella. Il gene CD64 è stato usato come campione interno. I livelli relativi di espressione sono stati calcolati con il metodo ciclico comparativo della soglia (16). Ogni codice categoria genotipico include tre animali, ogni animale esaminato in triplice copia. Il livello di espressione *Nramp1* nei monocytes BB-indotti è significativamente differente ( $P < 0.01$ ) dal livello in BB noninduced i monocytes e dai livelli nei monocytes di ab e di aa, indotti e noninduced. Il livello di espressione *Nramp1* in BB noninduced i monocytes è significativamente differente ( $P < 0.05$ ) dai livelli nei monocytes di ab e di aa, induce e noninduced. 3. Capacità degli oggetti di BB e di aa di controllare la replica intracellulare della specie della brucella. Ogni codice categoria genotipico include tre animali, ogni animale esaminato in triplice copia. I batteri intracellulari erano un postinfection contato di 18 h. Le differenze nella sopravvivenza intracellulare fra gli oggetti di BB e di aa sono tutto il significativamente differente ( $P < 0.01$ ). Mel 1, melitensis 1 serovar del B. del B.; Mel 2, melitensis 2 serovar del B. del B.; Mel 3, melitensis 3 serovar del B. del B.