

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI “FEDERICO II”

**Dottorato di ricerca in
Produzione e Sanità degli Alimenti di Origine Animale
XXII ciclo – 2006/2009**

Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta,
dell’Ambiente e delle Produzioni Animali

TESI DI DOTTORATO

*Analisi della variabilità genetica al locus
Mannose binding lectin (MBL) e studi di
associazione genotipo/fenotipo contro la
Brucella melitensis nella specie caprina*

Dott. Andrea Mancusi

Relatore:
Prof. Luigi Ramunno

Coordinatore:
Prof.^{ssa} MariaLuisa Cortesi

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	4
1.1. Resistenza genetica alle malattie infettive	4
1.2. <i>Brucella melitensis</i> e brucellosi	5
1.3. Epidemiologia.....	11
1.4. Il sistema immunitario.....	12
1.4.1. L'immunità acquisita	12
1.4.2. L'immunità innata.....	15
1.4.3. Il sistema del complemento	18
1.5. Mannose binding lectin e le sue proteasi	21
1.6. Struttura del gene MBL	24
1.7. Polimorfismi nel gene MBL	25
2. OBIETTIVO.....	27
3. MATERIALI E METODI.....	28
3.1. Preparazione dei campioni di DNA.....	28
3.2. Disegno dei primer.....	29
3.3. Amplificazione del DNA mediante PCR (Polymerase Chain Reaction).....	30
3.4. Purificazione e concentrazione dei prodotti di PCR.....	31
3.5. Sequenziamento dei frammenti amplificati.....	32
3.6. Metodica dell'ACRS-PCR (Amplification Created Restriction Site PCR) al 2° esone	32
3.7. Metodica della PCR-RFLP al 2° introne	34
3.8. Genotipizzazione	35
3.9. Attività antimicrobica.....	35



3.10. Odds Ratio	37
4. RISULTATI E DISCUSSIONI.....	40
4.1. Struttura del gene MBL di capra	40
4.2. Analisi delle regioni introniche.....	49
4.3. Analisi delle regioni esoniche.....	50
4.4. Analisi del promotore	51
4.5. Scelta dei marcatori da utilizzare per l'associazione con la <i>Brucella melitensis</i>	55
4.6. ACRS-PCR (Amplification Created Restriction Site PCR) al 2° esone	56
4.7. PCR-RFLP al 2° introne	57
4.8. Genotipizzazione delle mutazioni al promotore.....	58
4.9. Indagine di popolazione.....	59
4.10. Fenotipo	60
4.11. Associazione Genotipo-Fenotipo	61
5. CONCLUSIONI.....	62
6. BIBLIOGRAFIA	64

1. INTRODUZIONE

1.1 Resistenza genetica alle malattie infettive

La resistenza genetica è dovuta a uno o più geni che determinano la presenza di barriere strutturali o di sostanze chimiche, precostituite, che si oppongono all'attacco del patogeno (difese passive o costitutive) oppure che determinano l'attivazione di una serie di meccanismi di difesa nei confronti del patogeno che sta cercando di dar luogo ad un processo infettivo (difese attive). La resistenza dovuta ad uno o pochi geni viene definita monogenica o oligogenica o **resistenza verticale** e conferisce la capacità di resistere ad un singolo o pochi ceppi del patogeno. L'ospite reagisce generalmente all'infezione da parte del patogeno con una risposta ipersensibile: il gene di resistenza è solitamente coinvolto nel processo di riconoscimento ospite-patogeno, determinando una sostanziale incompatibilità tra l'individuo e l'agente eziologico della malattia. La resistenza verticale è estremamente efficace, ma determina, nel contempo, una pressione di selezione sulla popolazione del patogeno, nella quale possono diventare dominanti i ceppi che sono in grado di superare la resistenza opposta dall'individuo ospite e quindi di causare malattia.

La resistenza basata su più geni viene denominata poligenica o **resistenza orizzontale** ed è meno efficace di quella verticale, ma più durevole. La resistenza orizzontale è attiva nei confronti di tutti i ceppi di un dato patogeno, ma il suo livello di efficienza dipende dalle condizioni contingenti, quali, ad

esempio, la quantità di inoculo del patogeno. La resistenza poligenica non determina, infatti, nell'ospite una risposta ipersensibile, ma una serie di effetti che limitano i possibili danni. Il risultato finale potrebbe essere quello di diminuire la frequenza delle infezioni ed allungare la durata del periodo di incubazione (Belli G., 2006).

1.2 *Brucella melitensis* e brucellosi

La brucella fu isolata la prima volta nel 1887 a Malta, dal medico militare Bruce da 4 soldati britannici morti in seguito a “febbre di Malta” o “febbre ondulante”. Fu inizialmente denominata *Micrococcus melitensis* (Alton, 1990). Più tardi, nel 1904 fu evidenziata la presenza del patogeno nel latte di capre malate, stabilendone la trasmissione all'uomo. Infine il microrganismo fu isolato nella specie bovina da feti abortiti. Solo nel 1920 il microrganismo fu definitivamente ascritto al genere *Brucella*. I batteri del genere *Brucella* sono piccoli bacilli gram negativi, immobili, ed asporigeni. Sono catalasi e ossidasi positivi; aerobi stretti (alcuni ceppi di *Brucella abortus* e *Brucella ovis* richiedono in primo isolamento un'atmosfera arricchita del 5-10% di CO₂) (European commission, 2001). Gli zuccheri sono fermentati debolmente con produzione di acidi e non gas. Nei normali saggi di fermentazione, l'acidificazione non è rilevabile in quanto la forte attività ureasica posseduta da questi microrganismi fa virare rapidamente l'indicatore di pH verso l'alcalinità.

Riducono i nitrati a nitriti, non producono indolo e non crescono su substrati contenenti citrato come unica fonte di carbonio. Presentano una speciale affinità per i coloranti basici; crescono tra 20 e 40 °C con optimum a 37 °C. Pur avendo tutti gli stipiti del genere *Brucella* una spiccata analogia del DNA, ed un rapporto guanina/citosina compreso tra 55 e 59,5 sufficiente per includerli in una singola specie, tali patogeni vengono tuttora unanimemente suddivisi, in base ai caratteri biochimici, metabolici ed antigenici, in 6 specie: *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella canis*, *Brucella suis*, *Brucella ovis* e *Brucella neotomae* (Adel *et al.*, 2001). Le *Brucelle* in condizioni naturali sono abbastanza resistenti all'essiccamento e possono sopravvivere diverse settimane nell'ambiente esterno, nella polvere, nel concime e nel terreno poco soleggiato; rimangono vitali più a lungo (2-3 mesi) nei latticini (burro, formaggi etc.); sono inattivate dall'acidificazione del latte, dalla pastorizzazione e dai comuni disinfettanti; acido fenico all'1%, formaldeide, composti quaternari dell'ammonio etc. Inoltre hanno particolari esigenze naturali ed anche in terreni arricchiti di particolari peptoni (trypticase-soy) si sviluppano lentamente (Fekete *et al.*, 1990; Herman e Ridder, 1992). Le brucelle, diffuse in tutto il mondo, sono ospiti di diversi mammiferi selvatici e domestici nei quali causano infezioni, spesso a decorso asintomatico, o malattie, ed occasionalmente provocano infezione nell'uomo. Delle sei specie note soltanto tre sono patogene anche per il genere umano: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, rispettivamente ospiti naturali di ovi-caprini, bovini e suini (Alton, 1990). È da sottolineare che il rapporto

ospite-parassita, non è assolutamente “specifico” per cui i suddetti mammiferi sono sensibili a tutte e tre le specie così come l’uomo. Delle altre tre specie note, *B. canis*, *B. neotomae* e *B. ovis*, soltanto la prima, che provoca aborto ed epididimiti nei cani, può causare, sebbene raramente, malattia anche nell’uomo. La brucellosi si trasmette soprattutto a seguito del contatto con sangue, urine, tessuti, feti abortiti, secreti vaginali ed involgii fetali di animali infetti. I dati epidemiologici identificano nei seguenti alimenti i prodotti più a rischio di trasmissione: latte non pastorizzato e prodotti caseari ottenuti da latte non pastorizzato (crema, panna, formaggi freschi non fermentati o a breve stagionatura) (Hamdy e Adel., 2002). Quindi, l’inquinamento ambientale e la contaminazione del latte e dei latticini costituiscono le più comuni fonti del contagio. I fattori che influenzano il comportamento della Brucella in latte e derivati sono principalmente la temperatura, il NaCl, il contenuto in grasso ed il pH (Carrère *et al.*, 1960; Davies e Casey, 1973; Nicoletti, 1989; Plommet *et al.*, 1988).

La patogenicità delle brucelle è correlata, come per altri batteri gram negativi, al lipopolisaccaride della parete cellulare, la cui frazione esterna (polisaccaridica) ha la proprietà di interferire, più o meno attivamente, con le difese dell’ospite ed in particolare con la fagocitosi, rendendo possibile la sopravvivenza e la moltiplicazione delle brucelle all’interno dei fagociti. La frazione interna, lipidica (lipide A), costituisce il principio tossico attivo del lipopolisaccaride (endotossina), la cui liberazione provoca diversi effetti

biologici su organi e sistemi dell'ospite, ad espressività clinica. Anche se la maturazione dell'immunità umorale agevola la fagocitosi delle brucelle (opsonizzazione), gli stipiti più virulenti hanno la capacità di sopravvivere e replicare all'interno dei fagociti, sia per un maggiore contenuto di catalasi rispetto ai cloni meno virulenti, sia per la presenza nella parete cellulare di un enzima (superossido dismutasi) che blocca i meccanismi antibatterici. La maggiore o minore patogenicità è prevalentemente correlata all'entità della virulenza, variabile in rapporto a differenze quantitative e qualitative dei componenti del polisaccaride. È da rilevare che la virulenza di "base" può variare nello stesso biotipo in seguito a mutazioni o variazioni di fasi: liscia (S) o rugosa (R) (European commission, 2001). Le brucelle in condizioni ottimali, nei tessuti degli ospiti naturali (specie in quelli dell'apparato genitale) sono dotate di un polisaccaride di superficie completo ed efficiente ed appaiono in fase "S". Per adattarsi a situazioni ambientali sfavorevoli o poco consoni al loro normale metabolismo (terreni di coltura, latticini, concime, verdure etc.), perdono la capacità di sintetizzare il suddetto polisaccaride o operano sintesi difettiva, mutando nella fase "R", caratterizzata da una più o meno evidente riduzione della resistenza al killing fagocitario e quindi dalla perdita o dalla attenuazione della virulenza. Sembra che il passaggio da contagio ad infezione e da infezione a malattia sia condizionato più dalla virulenza che dall'entità della carica batterica. In effetti, microrganismi in fase "S" presenti nel canale del parto o negli scoli post-partum spesso provocano infezione negli allevatori e nei

veterinari, con una carica abbastanza modesta attraverso abrasioni o microlesioni cutanee. I ceppi più virulenti hanno la capacità di resistere agli enzimi litici e di sopravvivere e replicare, quali parassiti endocellulari, all'interno sia dei polimorfonucleati che dei monociti-macrofagi. In effetti, le brucelle, dopo la prima replicazione nella sede d'impianto, veicolati dai monociti e dai polimorfonucleati raggiungono dapprima i linfonodi regionali e quindi per via ematica i vari organi, localizzandosi nei macrofagi del Sistema Reticolo-Endoteliale (SRE); sono prevalentemente invasivi milza, fegato, midollo, linfonodi. La spiccata replicazione delle brucelle all'interno delle cellule ospiti comporta la liberazione della frazione interna (lipide A) che, diffondendo in circolo come endotossina libera, accompagnato o no da gittate batteriche, provoca fenomeni generali che caratterizzano la sintomatologia della brucellosi (ipertermia, brividi, sudorazione etc.). L'azione locale dell'endotossina a livello dei tessuti maggiormente interessati dalla replicazione batterica provoca iperemia, infiltrazione emorragica e lesioni degenerativo-necrotiche che si associano all'iperplasia del SRE e alla formazione di granulomi costituiti da cellule parassitate circondate da infiltrazione linfocitaria. L'infezione subclinica si verifica più spesso in individui a rischio (veterinari, allevatori, addetti alla macellazione etc) ed è caratterizzata da modesta febbre; le forme acute e subacute presentano, invece, sintomi aspecifici quali febbre, debolezza, brividi, anoressia, sudorazione eccessiva e maleodorante (odore di stalla), ingrossamento della milza, occasionalmente perdita di peso, dolori articolari e muscolari. La

febbre può essere continua, intermittente o ondulante (elevazioni termiche per alcune settimane seguite da 2 giorni di discesa fino al raggiungimento di valori normali) andamento che può ripetersi anche per mesi. Si parla di brucellosi localizzata e/o complicata nei quadri patologici in cui predomina il coinvolgimento di uno specifico organo (ossa, SNC, cuore, polmoni, milza, testicoli, fegato, colecisti, rene, prostata, cute, occhi), mentre quando la malattia ha decorso protratto, spesso causato da un'inadeguata terapia antibiotica, si presenta in forma cronica. Le brucelle sono sensibili in vitro a diversi antibiotici (tetracicline, aminoglicosidi, rifampicina, fluorchinolonici etc), ma essendo patogeni intracellulari, l'antibiotico, per essere efficace in vivo, deve avere la capacità di penetrare all'interno delle cellule e dei granulomi, proprietà correlata alla liposolubilità (Alton *et al.*, 1988). Tra le tetracicline è consigliabile adoperare quelle a lunga emivita (minociclina e doxiciclina), che, rispetto alle tetracicline classiche (clortetraciclina, ossitetraciclina, metilclortetraciclina), hanno un'ottima liposolubilità e, quindi, un migliore gradiente di diffusione nelle membrane biologiche; provocano, inoltre, minori effetti collaterali in quanto attive a dosi 10 volte più basse. Generalmente si pratica una terapia di associazione con rifampicina e doxiciclina per 6 settimane.

In conclusione, la brucellosi causa seri danni economici all'industria zootecnica ed a quella lattiero-casearia. Purtroppo, anche in paesi a sviluppo socioeconomico ed igienicosanitario ottimale, piccoli allevamenti sfuggono alla sorveglianza e, in alcune aree, il latte adoperato per il consumo diretto e per la

preparazione di latticini non viene pastorizzato; ciò comporta la persistenza di livelli endemici, anche se ridotti, rispetto al passato. In Italia le regioni più colpite sono Sicilia, Puglia, Campania e Calabria.

1.3 Epidemiologia

Nel grafico che segue (Figura 1), fornito dal centro di referenza nazionale per le brucellosi, è riportato un quadro riepilogativo dei dati relativi alla percentuale di aziende e capi ovi-caprini per il primo semestre del 2009.

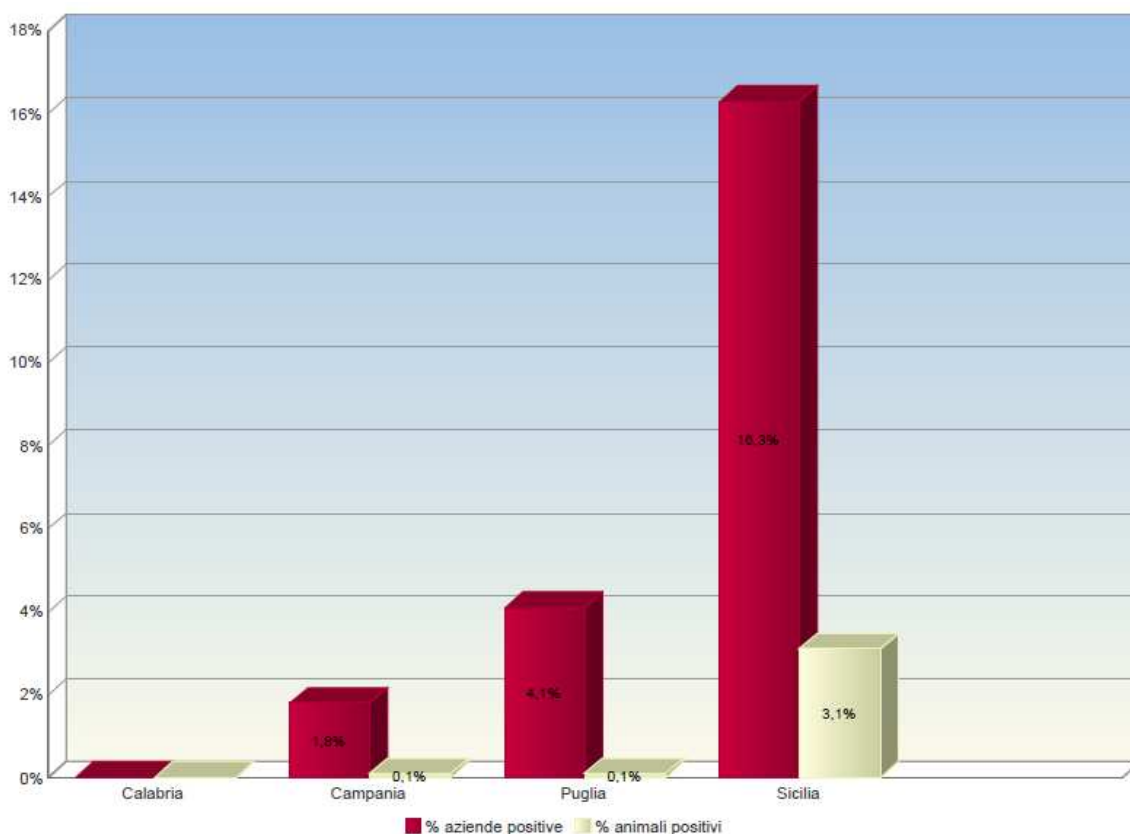


Fig. 1. Percentuale di aziende e capi ovi-caprini infetti

I dati dei controlli effettuati mostrano che la regione Sicilia presenta la maggiore percentuale sia di aziende infette (16,3%) (dove per positiva è intesa quell'azienda in cui il servizio veterinario ha indicato che almeno un capo è infetto) sia di animali brucellotici (3,1%). In Puglia ed in Campania si riducono sensibilmente sia le percentuali di positività alla Brucella nelle aziende (4,1% e 1,8%, rispettivamente) che di capi infetti (0,1%). La regione in cui non sono stati evidenziati né aziende infette né capi è la Calabria. Quest'ultimo dato, tuttavia, potrebbe essere dovuto alla bassa numerosità del campione (aziende/capi) preso in esame.

1.4 Il sistema immunitario

In ogni momento il nostro organismo è esposto ad attacchi da parte di agenti patogeni, ma solo nel momento in cui siamo colpiti da un processo infettivo, ci rendiamo conto di quanto sia indispensabile il sistema di difesa dell'organismo, ossia il sistema immunitario. Esso presenta due componenti: l'immunità acquisita e l'immunità innata.

1.4.1 L'immunità acquisita

I meccanismi dell'immunità acquisita sono risposte specifiche contro l'antigene, che sono innescati da una prima reazione aspecifica, che sfruttano anche molti meccanismi effettori, quelli cioè che concludono la catena di

interazioni che sono iniziate ancor prima dello stimolo e porteranno all'inibizione e/o eliminazione di sostanze estranee o dannose, all'uccisione o al confinamento di microrganismi, alla citolisi di cellule di altri organismi o dello stesso, quando infiltrate da virus o comunque modificate. La risposta effettrice specifica si articola su due fronti strettamente cooperanti:

- **la risposta umorale**, si basa sulla proliferazione di un clone di linfociti B in plasmacellule, ovvero cellule secernenti anticorpi;
- **la risposta cellulo-mediata**, rappresenta la funzione svolta dai linfociti T e agisce contro patogeni intracellulari o in grado di sopravvivere nei fagociti e contro le cellule neoplastiche.

L'immunità umorale è la principale difesa contro i patogeni extracellulari e le tossine. Essa può essere innescata con la collaborazione di linfociti T helper; non serve nel caso di antigeni polimerici, come i polisaccaridi della capsula batterica (antigeni T-indipendenti). Si ottiene in questo caso la sintesi quasi esclusiva di IgM, ma non la comparsa di una memoria immunologica. Nella maggior parte dei casi il meccanismo si innesca a partire dal riconoscimento da parte di un linfocita B vergine di un antigene, attraverso le molecole anticorpali che veicola sulla propria superficie. Per arrivare alla sintesi di anticorpi il linfocita B deve prima ottenere il "consenso" da una sottoclasse di linfociti T helper, i Th-2. Il Th-2 prende contatto con l'antigene, processato da una cellula fagocitaria (antigen

presenting cell) o dal linfocita B stesso ed esposto sulla membrana associato al complesso maggiore di istocompatibilità MHC-II. Esprime, a questo punto la sua azione stimolatoria esponendo sulla superficie la proteina CD40L e rilasciando citochine, che giocano un ruolo importante nella crescita, funzionamento e controllo delle cellule nel sistema immunitario (Poli e Cocilovo, 1996). Il processo si conclude con l'espansione clonale dei linfociti B e la trasformazione in due tipi di cellule: le plasmacellule, dotate di una lunga emivita, che sintetizzano gli anticorpi specifici, e le cellule memoria, un pool a lunghissima vita pronto a produrre grandi quantità di anticorpi in seguito ad un secondo contatto del soggetto con l'antigene. Gli anticorpi sostanzialmente fungono da mediatori a tre meccanismi di eliminazione dell'antigene:

- attivano la via classica del complemento;
- le IgG opsonizzano i microrganismi e, mediante il legame col recettore per Fc dei fagociti, favoriscono la fagocitosi della particella e potenziano le capacità microbicide;
- permettono la reazione di citotossicità mediata da anticorpi (ADCC o Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity). Le cellule natural killer NK reagiscono, con i loro recettori per l'Fc (CD16), con le IgG che opsonizzano la superficie di un bersaglio non-self. Il risultato è

l'attivazione delle NK che liberano il contenuto dei loro granuli e provocano la lisi del bersaglio (Abbas *et al.*, 2002).

L'immunità cellulo-mediata è condizionata dai linfociti T ed è indispensabile per la difesa contro microrganismi intracellulari, come virus e batteri, che proliferano all'interno delle cellule dell'ospite e quindi risultano essere inaccessibili agli anticorpi, ma accessibili ai linfociti T specifici che determinano la loro morte.

1.4.2 L'immunità innata

L'immunità innata si compone di meccanismi di difesa sia propriamente immunitari (cellule e fattori solubili) che non (barriere fisiche e chimiche). Queste ultime sono rappresentate dall'integrità delle superfici cutanee e mucose e da meccanismi di difesa ad essi associati tra i quali possiamo citare:

- il muco e l'epitelio cigliato che rivestono l'albero respiratorio;
- l'acidità del succo gastrico;
- proteine in grado di limitare la crescita batterica (lattoferrina, lisozima, etc.) (Arnold *et al.*, 1977);
- il pH cutaneo e le sostanze antibiotiche naturali prodotte dagli epitelii: le più note sono le defensine, proteine solforate contenute in gran quantità nei granuli dei neutrofili, la cui secrezione aumenta sotto lo stimolo di IL-

1 e TNF-alfa (Abbas *et al.*, 2002). Oppure le criptocidine, prodotte dall'epitelio intestinale con un significato del tutto analogo.

Le cellule protagoniste della risposta innata sono i fagociti cioè macrofagi, granulociti neutrofili, eosinofili e basofili e le cellule natural killer (NK).

La fagocitosi è l'evento che accomuna l'azione di tutte queste cellule, tranne le NK. I fagociti sono in grado di riconoscere strutture espresse unicamente dagli agenti patogeni e assenti sulle cellule normali dei mammiferi, quali: lipopolisaccaride, acido teicoico, nucleotidi CpG non metilati, peptidi n-formil-metioninici, glicani ricchi in mannosio, fosforilcolina e molecole correlate (di origine batterica) e RNA a doppia elica (di origine virale). Si tratta di un repertorio di specificità abbastanza limitato e che impedisce all'immunità innata di agire contro strutture autologhe (Abbas *et al.*, 2002). I fagociti principali sono i neutrofili, che intervengono nella fase più precoce del fenomeno infiammatorio, e i monociti-macrofagi, che pur intervenendo come seconda linea, permangono più a lungo nel focolaio. L'attività fagocitaria è promossa dalle cosiddette opsonine, molecole che rivestendo il microrganismo aumentano l'avidità dei fagociti; sono opsonine specifiche gli anticorpi IgG, aspecifiche sono il frammento C3 del complemento e molte proteine plasmatiche, tra cui le proteine di fase acuta: fibronectina, fibrinogeno, lectina legante il mannosio, proteina C-reattiva. L'eliminazione del microrganismo fagocitato avviene in un vacuolo citoplasmatico (fagolisosoma), derivato dalla

fusione del fagosoma con i lisosomi cellulari, attraverso la produzione di radicali liberi. Le cellule attivate subiscono un aumento esplosivo del metabolismo, detto appunto “burst ossidativo”.

Le cellule natural killer sono una sottopopolazione di linfociti T, privi del “recettore dei linfociti T” (TCR), in grado di lisare cellule infettate da virus e altri patogeni intracellulari; portano in superficie molecole in grado di riconoscere l’MHC di classe I, che trasmettono un segnale inibitorio e recettori attivatori. Se una cellula sulla propria superficie non possiede un numero adeguato di MHC I, questa non è riconosciuta come self e le NK ne inducono la morte liberando perforine, che ledono la membrana cellulare, e granzimi, portatori di un segnale pro-apoptotico.

Le cellule dell’immunità innata lavorano in sinergia con fattori solubili come:

- le proteine del complemento: una famiglia di proteine che fa da tramite tra il riconoscimento batterico e le funzioni effettrici, mediano la lisi osmotica batterica, la fagocitosi e la chemiotassi dei neutrofilo verso il focolaio infiammatorio;
- i fattori della coagulazione: un gruppo di proteine che si attivano a cascata quando una di queste, il fattore di Hageman, incontra collagene o membrana basale esposta o piastrine attivate. Il fine di questa cascata di reazioni è creare un coagulo;

- le pentraxine: la più conosciuta è la proteina C-reattiva, una opsonina che riconosce fosfolipidi batterici;
- gli anticorpi naturali (Nab): sono prodotti da una sottopopolazione di linfociti B, le cellule B1, che presentano un recettore Ig scarsamente diversificato. Queste elaborano IgM multimeriche rivolte contro i batteri comunemente presenti nell'ambiente, senza necessità di un contatto pregresso. I Nab si distinguono dagli anticorpi della risposta adattativa umorale perché interagiscono con un range di antigeni altamente conservati durante l'evoluzione, anche autologhi. Il fatto che reagiscano con determinanti del CD45, CD4, CD5, CD8 e MHC fa supporre che abbiano anche una funzione immunoregolatoria (Berczi *et al.*, 1998);
- le collectine, delle quali fa parte la Lectina legante il Mannosio (Mannose binding lectin o MBL). Essa interagisce con i residui di mannosio o fucosio presenti sulla parete batterica ed è in grado di attivare la “via lectinica” del complemento; inoltre funge da opsonina legando il recettore per il C1q macrofagico.

1.4.3 Il sistema del complemento

Il **sistema del complemento**, insieme con gli anticorpi, rappresenta l'elemento essenziale dei meccanismi di difesa umorali contro gli agenti infettivi. Esso è costituito da una ventina di proteine circolanti e di membrana,

capaci di interagire reciprocamente e con le membrane cellulari (Rother *et al.*, 1997). L'attivazione a cascata delle sue proteine solubili, che convenzionalmente sono chiamate componenti, è alla base di attività biologiche varie come la lisi cellulare, batterica o virale, queste si introducono nelle membrane degli agenti patogeni provocando su di esse pori che portano alla lisi. Durante l'attivazione del complemento si ha, inoltre, il reclutamento di varie cellule immunocompetenti, quali cellule fagocitarie (monociti, macrofagi, polinucleati), linfociti B e linfociti T (Muller-Eberhard *et al.*, 1998; Volanakis *et al.*, 1998).

Il termine complemento fu usato per la prima volta nel 1898 da J. Bordet che aveva notato che, se incubava una miscela di batteri con siero contenente anticorpi rivolti contro i batteri stessi, questi venivano lisati (distrutti); se invece il siero veniva riscaldato ad una temperatura di 56 °C la lisi non avveniva. Poiché era stato già dimostrato che gli anticorpi resistevano al riscaldamento, Bordet ipotizzò la presenza nel siero di un componente termolabile che completava l'azione degli anticorpi e che battezzò appunto complemento.

Il complemento è uno dei meccanismi di difesa più importanti del sistema immunitario, sia nella risposta naturale sia in quella acquisita. La sua attivazione può realizzarsi attraverso le seguenti vie: classica, alternativa e delle lectine (Figura 2).

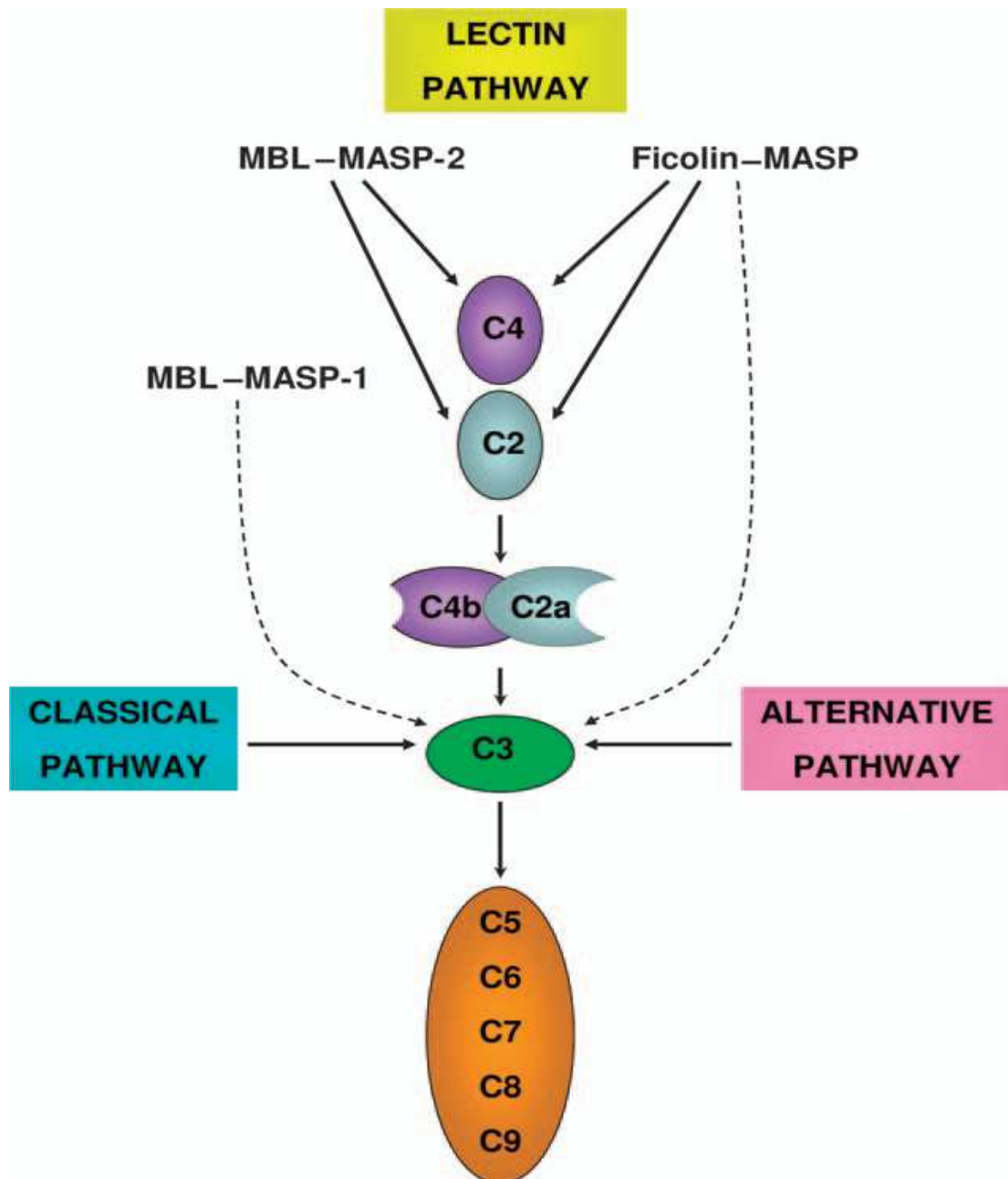


Fig. 2. Tre vie di attivazione del sistema del complemento

Attivazione del complemento per via classica: si attiva soltanto nella risposta specifica indotta dalla reazione antigene-anticorpi (risposta acquisita). Le proteine si attivano a cascata per formare il complesso che aderisce alla membrana del microrganismo o della cellula infettata, che hanno previamente reagito con gli anticorpi, e ne provocano la lisi.

Attivazione del complemento per via alternativa: scoperta successivamente, che si attiva dopo il legame del C3 a particolari strutture presenti sulla superficie microbica, ma anche di funghi, virus e parassiti, o dopo legame con prodotti di degradazione cellulare.

Attivazione del complemento per via delle lectine: si attiva in seguito all'interazione fra carboidrati, ad esempio polisaccaridi microbici, ed MBL. La via della **lectina legante il mannosio** utilizza una proteina molto simile a C1q, la lectina legante il mannosio o MBL (*Mannose binding lectin*). L'MBL è capace di attivare il complesso di attacco del complemento e provocare la lisi della membrana di diversi microrganismi senza necessità dell'attivazione degli anticorpi. Questa proteina lega specificamente residui di mannosio, di fucosio e di altri zuccheri, che sono presenti sulle superfici cellulari di molti patogeni, legati a proteine o lipidi. Sulla superficie cellulare dei vertebrati sono presenti altri tipi di zuccheri, ad esempio l'acido sialico. In questo modo l'MBL è in grado di discriminare il tipo di membrana di attacco e di innescare l'attivazione del complemento esclusivamente sulla superficie del patogeno.

1.5 Mannose Binding Lectin e le sue proteasi

La struttura della MBL è stata ampiamente studiata e consiste di multimeri di un'identica catena polipeptidica di 32 KDa. Ogni catena comprende 4 diversi domini strutturali (Dommet *et al.*, 2006):

- dominio posto all’N-terminale, ricco di cisteina ed essenziale per la successiva organizzazione della molecola in oligomeri
- dominio simil-collagene, responsabile di una lunga “coda” nella molecola
- la regione “collo”, che possiede una funzione strutturale
- la “testa” globulare posta al C-terminale, responsabile di legare i residui oligosaccaridici disposti sulla superficie dei patogeni (attività lectinica)

L’omotrimero, al microscopio elettronico, assume una conformazione caratteristica, ovvero a “mazzo di tulipani”, determinata da una coda a tripla elica nella regione simil-collagene e da un grappolo a tre teste di domini lectinici (Figura 3).

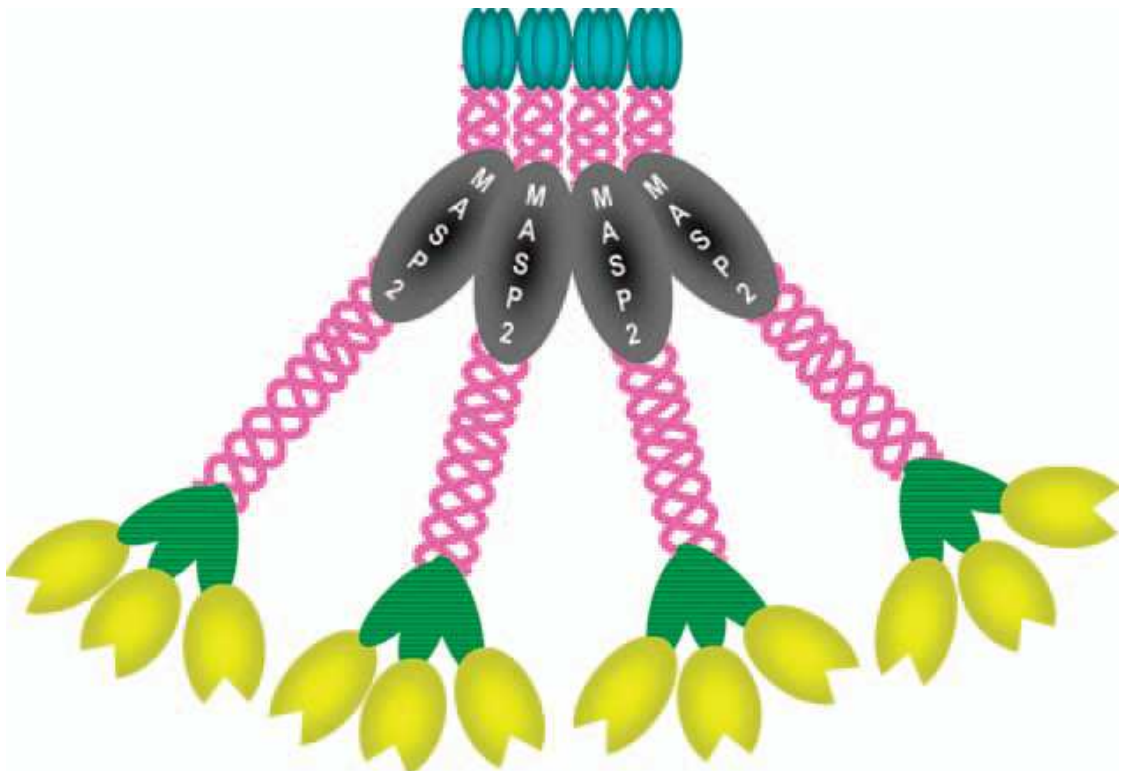


Fig. 3. Struttura a “mazzo di tulipani” dell’oligomero dell’MBL

I monomeri, inoltre, si assoceranno nel dominio N-terminale. Quest'ultima porzione è responsabile del legame della proteina con il recettore per le collectine situato sui fagociti. Il raggruppamento delle subunità strutturali fornisce una piattaforma, permettendo il legame dell'MBL con una gamma di zuccheri presenti sulla superficie dei microrganismi. Sebbene l'affinità di legame di ciascuna interazione tra il dominio di riconoscimento del carboidrato e lo zucchero è relativamente bassa, pari a 10^3 M (Iobst *et al.*, 1994), la formazione di oligomeri di maggiore lunghezza costituisce un modo per la MBL di legare gli zuccheri batterici con una maggiore avidità.

La MBL forma un complesso con due zimogeni proteasici, MASP-1 e MASP-2. Insieme queste proteine formano il MBL complex. MASP-1 e MASP-2 sono strettamente omologhi a C1r e C1s (Schwaeble *et al.*, 2002; Turner, 1996).

Queste 2 proteine svolgono un ruolo molto importante per l'attività effettrice della proteina: la MASP2, che ha un ruolo ben definito nell'attivazione del complemento (Thiel *et al.*, 1997), è identica all'esterasi C1 nella via classica del complemento ed è in grado di scindere C4 e C2 formando C4b2a, che agisce come una C3-convertasi scindendo C3, formando C3b e inducendo l'opsonizzazione del microrganismo (Kerr, 1980). Il ruolo della MASP1 non è ancora ben conosciuto: essa cliva il C2 ma non il C4, in modo che possa migliorare l'attivazione del complemento innescato dal complesso MASP2-lectina, ma non è in grado di attivarlo da sola (Chen e Wallis, 2004).

1.6 Struttura del gene MBL

Sono state individuate 2 forme del gene MBL, ma solo l'MBL2 codifica per una proteina funzionale, mentre l'MBL1 risulta essere uno pseudogene. Le due forme del gene sono state descritte nel coniglio (Kawasaki *et al.*, 1978; Kozutsumi *et al.*, 1980; Kozutsumi *et al.*, 1981), nella scimmia (Mogues *et al.*, 1996), nel suino (Dlabac e Kawasaki, 1994; Storgaard *et al.*, 1996), nel ratto (Mizuno *et al.*, 1981; Maynard e Baenziger, 1982; Oka *et al.*, 1988) e nel topo (Ihara *et al.*, 1982; Sastry *et al.*, 1991). Mentre la forma funzionale (MBL2) è stata descritta solo nell'uomo (Kawasaki *et al.*, 1983; Wild *et al.*, 1983) e nel bovino (Sugii e Hirota, 1991; Andersen *et al.*, 1992; Holmskov *et al.*, 1993).

Nell'uomo, il gene codificante l'MBL (EMBL acc. n° NG_008196) mappa sul cromosoma 10, si estende su un tratto di 6,3 Kb, ed è organizzato in 4 esoni e 3 introni di lunghezza variabile (Sastry *et al.*, 1989).

Generalmente, l'esone 1 codifica per un peptide segnale ricco di cisteine e una parte di glicine ricche di collagene, l'esone 2 codifica per la restante parte del collagene, l'esone 3 codifica per la struttura coiled-coil ad α -elica conosciuta come regione "neck", infine, l'esone 4 codifica per il dominio del carboidrato che adotta una configurazione globulare. La regione promotrice del gene MBL2 contiene un numero di elementi regolatori che influenzano la trascrizione della proteina.

A livello genomico, tra gli animali d'interesse zootecnico è stato sequenziato parzialmente l'MBL bovino (EMBL acc. n° NC_007327). In particolare è stata determinata la sequenza genomica compresa tra 1° nt del primo esone ed il 1013° nt del quarto esone (4,2 Kb) più 1063 bp del 5' UTR. Il gene in tale specie mappa sul cromosoma 26 e, analogamente alla specie umana, è organizzato in 4 esoni e 3 introni. A livello di cDNA, per le specie di interesse zootecnico, in banca dati sono presenti le sequenze parziali del bovino (EMBL acc. n° NM_174107), del suino (EMBL acc. n° NM_214125) e dell'equino (EMBL acc. n° DQ372924).

1.7 Polimorfismi nel gene MBL

Nell'uomo, l'analisi del gene ha evidenziato 3 mutazioni non conservative sul primo esone: una trasversione C → T al 223° nt e due transizioni G → A al 230° e al 239° nt, rispettivamente. Nella proteina tali mutazioni coinvolgono i codoni 52, 54 e 57 e generano tre varianti alleliche denominate rispettivamente D, B e C, mentre il wild-type è denominato con A (Turner, 1996). La variante D, determina la sostituzione di un residuo di arginina con uno di cisteina (Madsen *et al.*, 1994) ed è stato ipotizzato da Wallis e Cheng (1999) che l'introduzione di un ulteriore residuo di cisteina a livello della regione N-Terminale causi la formazione di ponti disolfuro intercatena casuali, impedendo la produzione di oligomeri funzionali ad alto peso.

Le varianti B e C, si caratterizzano entrambe per la sostituzione di un residuo di glicina con un residuo amminoacidico carico negativamente (Asp e Glu), interrompendo la sequenza ripetuta in tandem Gly X-Y impedendo, pertanto, la formazione d'interazioni idrofobiche che compromettono la struttura terziaria della proteina (Sumiya *et al.*, 1991). Sono stati, inoltre, studiati diversi polimorfismi a livello del promotore del gene dell'MBL: una sostituzione di una guanina con una citosina alle posizioni -550 e -221 a livello del promotore del gene per MBL porta alla formazione delle varianti H(-550g)/L(c) e Y(-221g)/X(c), rispettivamente (Madsen *et al.*, 1995). Dalla letteratura si evidenzia che l'aplotipo HYA/HYA determina il livello più alto di MBL nel siero e conferisce, ad esempio, un'elevata resistenza alla tubercolosi, mentre, gli aplotipi LYB e LYD attribuiscono un'alta probabilità di contrarre la malattia (Capparelli *et al.*, 2009).

Nella specie bufalina, analogamente a quanto descritto nell'uomo, sono stati individuati diversi polimorfismi sia nella regione promotrice che a livello del primo esone. Capparelli *et al.* (2008) riportano che tali mutazioni sono associate ad una resistenza alla *Brucella abortus*.

2. OBIETTIVO

L'obiettivo della presente ricerca è lo studio della variabilità genetica al *locus* MBL nella specie caprina finalizzata all'individuazione di marcatori utili per studi di associazioni alla resistenza nei confronti della *Brucella melitensis*.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Preparazione dei campioni di DNA

La ricerca è stata condotta sul DNA estratto dai leucociti recuperati da campioni individuali di sangue (40 ml) di capre allevate in provincia di Catanzaro, utilizzando come anticoagulante Na₂EDTA.

Dopo il prelievo, l'estrazione è stata eseguita secondo quanto indicato da Gossens e Kan (1981).

Reagenti:

- NaCl 1,8%;
- Tampone lisi I (0,1 M NaCl, 10mM Tris HCl pH 7,8);
- Tampone lisi II (tampone lisi I reso 1% SDS, 0,2-0,4 mg/ml proteinasi K);
- Fenolo bufferato;
- SEVAG: cloroformio-alcool isoamilico 24:1 (v/v);
- TE pH 7,6 (10 mM Tris pH 7,6, 1 mM EDTA);
- EDTA 0,5 M pH 8,0;
- Isopropanolo.

I campioni sono stati centrifugati a 4°C a 3000 rpm per 10 minuti, in modo da separare i leucociti dagli eritrociti e dal plasma. Con una pipetta Pasteur sono stati recuperati i leucociti, i quali sono stati risospesi in 7 ml di

H₂O deionizzata, in modo da lisare gli eritrociti residui; successivamente i leucociti sono stati riportati in condizioni isosmotiche mediante l'aggiunta di 7 ml di una soluzione 1,8% NaCl e quindi nuovamente centrifugati a 3000 rpm per 10 minuti. Allontanato il surnatante, i leucociti sono stati lisati aggiungendo 7 ml di tampone lisi I (0,1 M NaCl; 0,005 M Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA, pH 8) e 7 ml di tampone di lisi II addizionato di 1% SDS e 0,2-0,4 mg/ml di proteinasi K. Dopo incubazione over night a 37 °C, i campioni sono stati sottoposti a due estrazioni, una con fenolo e l'altra con cloroformio/alcool isoamilico (rapporto 24:1) per allontanare la componente proteica. Infine, il DNA è stato precipitato mediante l'aggiunta di un volume di isopropanolo freddo e risospeso in tampone TE (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM EDTA, pH 8).

3.2 Disegno dei primer

I primer utilizzati per l'amplificazione del gene MBL caprino sono stati disegnati avvalendosi del software DNASIS-Pro (Hitachi), come stampo sono state utilizzate le sequenze relative al DNA genomico bovino depositato in Banca Dati (EMBL acc. n° NC_007327). Successivamente, sono stati disegnati altri primer utilizzando come stampo le regioni sequenziate nel corso della ricerca (Tabella 1).

<i>NOME PRIMER</i>	<i>SEQUENZA</i>
MblBosF5 (Forward)	5' - TTGGTAAATGGATCTGGGGT - 3'
MblPecR5 (Reverse)	5' - GTTCTCCCTTTTCTCCCTTG - 3'
FMblEx1 (Forward)	5' - CTTTTCTTCTCCTGACTGCG - 3'
RMblEx2 (Reverse)	5' - CTCCTTTTTGGCCTATTGGT - 3'
MblInt1F (Forward)	5' - GCTTTTCTTCTATGGTCCTT - 3'
MblInt2R (Reverse)	5' - ACATACTATGTATCTACCGC - 3'
MblF2 (Forward)	5' - GAGACCCTGGAGAAAATATG - 3'
MblR3 (Reverse)	5' - GTAGAGTTGCTCTTTCTGAAG - 3'
MblF2Int (Forward)	5' - GCATGTGGAGAGCTATAAT - 3'
MblR4Ex (Reverse)	5' - AGATTTATCCTCCAAACCAG - 3'
MblPF3 (Forward)	5' - CTACCCCCTTATAGTTCTAA - 3'
MblPR4 (Reverse)	5' - TCCAGCCCAAGATATTTTTC - 3'
MblFor3 (Forward)	5' - AAGAGCAACTCTACAATCTG - 3'
MblRev4 (Reverse)	5' - GCTTCAGGGTCTTTTCAAAT - 3'
MF3I (Forward)	5' - AGACCCTGATTCTGCTTCTT - 3'
MR3II (Reverse)	5' - TCTATAGTACAGATGCCGCA - 3'
MP4ExF (Forward)	5' - TGGAATGACATCGCTTGCTC - 3'
MB4ExR (Reverse)	5' - AGTCCTTCCAATGAACACCT - 3'

Tab1. Primer utilizzati per il sequenziamento del gene MBL nella capra

3.3 Amplificazione del DNA mediante PCR (Polymerase Chain Reaction)

La PCR è una metodica che consente l'amplificazione selettiva di sequenze di DNA attraverso una serie di duplicazioni successive mediate da una DNA polimerasi. La specificità del frammento amplificato è data dalla coppia di oligonucleotidi (primer) che sono utilizzati per innescare l'intero processo. L'amplificazione si realizza attraverso la ripetizione ciclica di tre fasi:

denaturazione, annealing ed estensione. Una tipica reazione di PCR è stata eseguita in 50 µl di mix che comprendono: 100 ng di DNA genomico, 10 pmol di ciascun primer, 1,25 U di Taq DNA polimerasi (Promega, Madison, WI), 50 mM di KCl, 10 mM di Tris HCl (pH 9,0), 0,1% di Triton X-100, 1,5 mM MgCl₂, dNTPs (ciascuno ad una concentrazione di 200 µM).

Il programma di amplificazione comprende i seguenti 32 cicli (Tabella 2):

CICLI	DENATURAZIONE	ANNEALING	ESTENSIONE
1	97 °C x 2'	56-65.5 °C x 45''	72 °C x 2'30''
32	94 °C x 45''	56-65.5 °C x 45''	72 °C x 2'30''
1	94 °C x 45''	56-65.5 °C x 45''	72°C x 10'

Tab. 2. Programma termico di amplificazione per la PCR

3.4 Purificazione e concentrazione dei prodotti di PCR

Una successiva fase ha previsto la purificazione dei campioni di DNA dai residui di amplificazione, impiegando il kit NucleoSpin Extract fornito da Macherey-Nagel. Lo stesso kit è stato utilizzato anche per l'estrazione e la purificazione del DNA dal gel. Il protocollo si basa sull'impiego di speciali buffer che in presenza di un'alta concentrazione di "chaotropic-salt", consente un assorbimento selettivo e quantitativo degli acidi nucleici ad una membrana di silice, mentre le contaminazioni da sali e componenti macromolecolari sono rimossi da due lavaggi con buffer a base di etanolo. Infine, attraverso una semplice eluizione è stato possibile portare il DNA in soluzione. Ottenuta la

soluzione contenente DNA puro, si è passato alla quantificazione spettrofotometrica; inoltre il campione è stato controllato sul gel di agarosio (corsa di 30 minuti a 100 Volt), usando come tracciante bromuro di etidio, per accertare l'assenza di RNA e DNA contaminanti.

3.5 Sequenziamento dei frammenti amplificati

Dai campioni ottenuti sono state ricavate aliquote contenenti in media 100 ng di DNA a cui sono state aggiunte 1,6 pmoli del primer corrispondente al frammento amplificato. La soluzione è stata quindi inviata presso il Servizio di Sequenziamento del DNA – Istituto Nazionale di Apicoltura – di Bologna, che ha provveduto al sequenziamento del frammento d'interesse mediante il metodo enzimatico di Sanger (Sanger, 1988). La sequenza ottenuta è stata quindi comparata con quelle riportate in letteratura e depositate alla GeneBank del National Center of Biotechnology Information (Altschul *et al.*, 1997).

3.6 Metodica dell'ACRS-PCR (Amplification Created Restriction Site PCR) al 2° esone

Per l'ACRS-PCR, è stato disegnato un primer forward modificato dal nucleotide in posizione 97 a 115 (AcrsFmut) del 2° esone, dove, alla posizione 113, è stato sostituito il nucleotide C con la T per creare un sito di restrizione per

l'endonucleasi *Hsp92II*. La sequenza del primer reverse corrisponde dal nucleotide 79 a 96 del 2° introne (TenR).

AcrsFmut (forward): 5'-GAGACCCTGGAGAAAA**C**AT-3'

TenR (Reverse): 5'-CCCAGGAAGCAGCAGAAG-3'

Per il marcatore localizzato al nucleotide 116 del 2° esone, la reazione di PCR è stata eseguita in 50 µl di mix che comprendono: 100 ng di DNA genomico, 10 pmol di ciascun primer (AcrsFmut e TenR), 1,25 U di Taq DNA polimerasi (Promega, Madison, WI), 50 mM di KCl, 10 mM di Tris HCl (pH 9,0), 0,1% di Triton X-100, 1,5 mM MgCl₂, dNTPs (ciascuno ad una concentrazione di 200 µM).

Il programma di amplificazione comprende i seguenti 37 cicli (Tabella 3):

CICLI	DENATURAZIONE	ANNEALING	ESTENSIONE
1	95 °C x 4'	-	-
37	95 °C x 1'	60,5 °C x 45''	72 °C x 1'
1	-	-	72°C x 5'

Tab. 3. Programma termico di amplificazione per l'ACRS-PCR al 2° esone

La digestione di 40 µl di ciascun prodotto di PCR è stata effettuata aggiungendo 10 U dell'enzima di restrizione *Hsp92II* [NCATG!N] (MBI Fermentas, Hanover, MD) e incubando a 37°C per 5 ore.

3.7 Metodica della PCR-RFLP al 2° introne

Per il marcatore localizzato al nucleotide 190 del 2° introne, la reazione è stata eseguita in 50 µl di mix che comprendono: 100 ng di DNA genomico, 10 pmol di ciascun primer (MblInt1F e MblInt2R), 1,25 U di Taq DNA polimerasi (Promega, Madison, WI), 50 mM di KCl, 10 mM di Tris HCl (pH 9,0), 0,1% di Triton X-100, 1,5 mM MgCl₂, dNTPs (ciascuno ad una concentrazione di 200 µM).

Il programma di amplificazione comprende i seguenti 29 cicli (Tabella 4):

CICLI	DENATURAZIONE	ANNEALING	ESTENSIONE
1	94 °C x 2'	-	-
29	94 °C x 45''	58 °C x 45''	72 °C x 1'30''
1	-	-	72°C x 10'

Tab. 4. Programma termico di amplificazione per la PCR-RFLP al 2° introne

Le sequenze dei due primer corrispondono rispettivamente ai nucleotidi 231 - 251 del 1° introne (MblInt1F) e ai nucleotidi 325 - 344 del 2° introne (MblInt2R):

MblInt1F (forward): 5'-GCTTTTCTTCTATGGTCCTT-3'

MblInt2R (reverse): 5'-ACATACTATGTATCTACCGC-3'

La digestione di 40 µl di ciascun prodotto di PCR è stata effettuata aggiungendo 10 U dell'enzima di restrizione *HinfI* [G!ANTC] (MBI Fermentas, Hanover, MD) e incubando a 37°C per 5 ore.

3.8 Genotipizzazione

La tipizzazione degli individui per i marcatori al livello del promotore (-892, -802 e -62) è stata commissionata alla ditta Kbiosciences (Herts, UK, <http://www.kbioscience.co.uk>) che per l'analisi utilizza Amplifluor™ (Serologicals™) e Taqman™ (Applied Biosystem™).

I singoli campioni di DNA delle 218 capre esaminate sono stati concentrati a 7ng/µl attraverso lettura allo spettrofotometro e sono stati eseguiti dei controlli negativi su acqua e delle repliche intra e inter-piastra.

3.9 Attività antimicrobica

La *Brucella melitensis* è stata inoculata in triptone soia broth (TSB) (Oxoid, Basingstoke Hampshire, UK) fino al raggiungimento della fase esponenziale incubando a 37 °C per 48 ore. La concentrazione batterica è stata calcolata attraverso lettura allo spettrofotometro e la sospensione contenente il patogeno è stata diluita in tampone fosfato (PBS), ottenendo una concentrazione pari a 1×10^6 CFU/ml.

Per ciascun soggetto preso in esame, sono state utilizzate 2 eppendorf contenenti 100 µl di siero, una delle quali, al fine di disattivare le proteine del sistema del complemento, è stata sottoposta a 56 °C per 30 minuti in un bagnetto termostato.

In una piastra in polistirene Multiwell per colture cellulari presterilizzata a 96 pozzetti sono stati inoculati 100 µl della soluzione brucella/PBS e 100 µl di siero attivo ed inattivo di ciascuno campione ed incubata a 37 °C per 24 ore in presenza del 5% di CO₂ e 95% di aria, al termine del quale sono state preparate 4 diluizioni seriali (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ e 10⁻⁴) con PBS delle due soluzioni, per ogni singolo campione. Successivamente, sono state preparate delle piastre Petri contenenti come substrato nutritivo Brucella Agar (SIMAD, Nocera Inferiore, Salerno) e, per rendere il terreno maggiormente selettivo alla *Brucella melitensis*, è stato utilizzato Brucella Supplement (SIMAD, Nocera Inferiore, Salerno). Sulle piastre opportunamente suddivise in 4 regioni sono stati caricati 5 spot da 10 µl ciascuno per ognuna delle 4 diluizione ottenute ed incubate a 37 °C per 48 ore in presenza del 5% di CO₂ e 95% di aria.

La fase successiva è stata quella di contare il numero di colonie originate da ciascuno dei 5 spot per la sola diluzione 10⁻⁴, facendone una media e normalizzando il valore ottenuto moltiplicando per 10⁶. La conta è quindi espressa come numero di *unità formanti la colonia*, CFU, ottenute assumendo che ogni cellula batterica dia origine ad 1 colonia. I valori ottenuti sono stati,

infine, riportati in logaritmo in base 10. La differenza tra il valore logaritmico del siero attivo e quello inattivo indica l'attività fagocitica del campione.

3.10 Odds Ratio

La misura (o quantificazione) di un'associazione rappresenta uno fra i passi più importanti da compiere nell'indagine sulle cause delle malattie o di un'azione di prevenzione o ancora, più in generale, nell'investigazione su un qualsiasi rapporto causa-effetto. L'impostazione dello studio considera due gruppi di soggetti:

1. I casi, ossia gli individui affetti dalla stessa malattia in studio o da particolare condizione.
2. I controlli, ossia gli individui con le stesse caratteristiche dei primi (età, sesso etc) ma con l'unica differenza di essere sani.

I risultati di uno studio retrospettivo possono essere descritti in una tabella a doppia entrata, detta anche tabella di contingenza, poiché è usata per determinare se la distribuzione di una variabile dipende in maniera condizionata dall'altra (tabella 5)

	CASI	CONTROLLI
ESPOSTI	A	B
NON ESPOSTI	C	D

Tab.5. Tabella di contingenza

Una volta preparata la tabella con i dati a disposizione, si può impostare l'analisi, confrontando la proporzione degli esposti nel gruppo dei casi $[A/(A+C)]$, con la proporzione degli esposti nel gruppo dei controlli $[B/(B+D)]$ (confronto fra le colonne). Un'associazione tra malattia e fattore di rischio è presente quando la percentuale degli esposti tra i casi è significativamente maggiore di quella degli esposti nel gruppo di controllo. Per facilitare l'analisi, invece di calcolare le proporzioni tra le frequenze osservate nei casi e nei controlli si possono calcolare i rapporti (odds), attraverso il calcolo dell'odds ratio (prodotto delle celle in tabella 5):

$$\text{Odds ratio} = \frac{\text{Odds cast}}{\text{Odds controlli}} = \frac{A/B}{C/D}$$

Un valore uguale a 1 indica l'assenza di associazione tra malattia ed esposizione, un valore minore di 1 indica un'associazione negativa (cioè il fattore può proteggere dalla malattia), e, infine, un valore maggiore di 1 indica un'associazione positiva (cioè il fattore può causare la malattia). Un ulteriore parametro di fondamentale importanza negli studi caso-controllo è l'intervallo di confidenza che fornisce informazioni riguardo alla precisione dei valori ottenuti. Un intervallo di confidenza è un range di valori che include, con una prefissata probabilità (di solito il 95%), il vero valore che si vuole stimare. Si calcola applicando la seguente formula:

$$\ln(OR) \pm 1,96 \sqrt{\frac{1}{A} + \frac{1}{B} + \frac{1}{C} + \frac{1}{D}}$$

dove 1,96 è un valore costante e il segno \pm permette il calcolo del limite superiore e del limite inferiore dell'intervallo.

Infine, per il calcolo delle frequenze alleliche, l'equilibrio di Hardy-Weinberg e l'odds ratio è stato utilizzato il programma statistico SAS (<http://support.sas.com/rnd/app/download.html>).

4. RISULTATI E DISCUSSIONI

4.1 Struttura del gene MBL di capra

Usando come template il DNA genomico estratto dai leucociti ottenuti da campioni individuali di sangue di 3 capre appartenenti ad una popolazione locale allevata in provincia di Catanzaro, è stato sequenziato il gene Mannose binding lectin (MBL) dal 1° nucleotide del 1° esone al 417° nt del 4° esone per un totale di 3538 basi più 978 bp della regione 5' UT. Una tra le particolarità del gene MBL nella specie caprina, oltre a presentare una maggiore percentuale di A/T rispetto al contenuto in G/C (56,5% vs 43,5%), è quella di caratterizzarsi per una struttura particolarmente semplice. Tale gene è, infatti, organizzato in 4 esoni e 3 introni (Figura 4). Dal confronto con l'omologa sequenza del gene MBL bovino (EMBL acc. n° NC_007327) è stato possibile definire la grandezza dei primi tre esoni: 200 bp (esone 1), 117 bp (esone 2) e 69 bp (esone 3), mentre del 4° esone si dispone solo della sequenza codificante (371 nt) più 46 nt della regione trascritta ma non tradotta. I 3 introni sequenziati hanno una lunghezza di 385 bp (introne 1), 1347 bp (introne 2) e 1019 bp (introne 3). Tutte le giunzioni di splice seguono la regola comune 5'GT/ 3'AG. L'ORF (Open Reading Frame) codifica per 249 residui amminoacidici, mentre il peptide leader è costituito da 19 amminoacidi. Il codone di inizio (ATG, Metionina) si realizza tra l'11° e il 13° nucleotide del 1° esone, mentre lo stop codon (TGA) tra il 372° e il 374° nucleotide del 4° esone.

La sequenza ottenuta è stata depositata in EMBL con il numero di accesso AM933377 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed>).

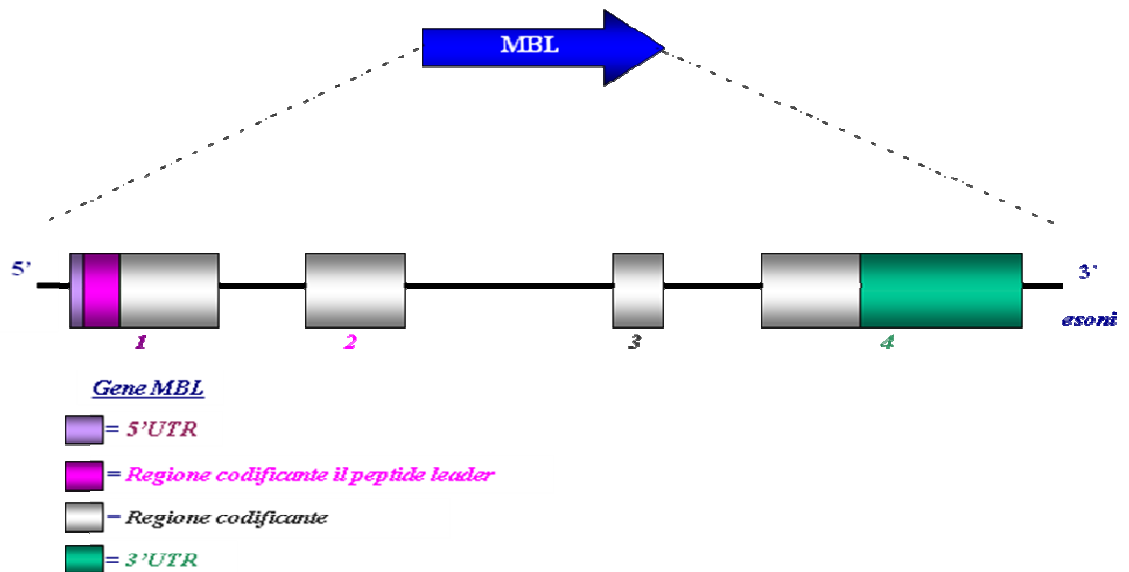


Fig. 4. Struttura del gene Mannose binding lectin (MBL) nella specie caprina

L'organizzazione generale del gene MBL caprino è simile a quella osservata sia nella specie bovina (EMBL acc. n° NC_007327) che in quella ovina (EMBL acc. n° AM933378) con un'omologia di sequenza pari al 90,9% e 92,9%, rispettivamente. Le differenze sono dovute sia a singole sostituzioni nucleotidiche che ad inserzioni/delezioni realizzatesi a livello intronico ed esonico (Figura 5).

	10	20	30	40	50		
	Esone 1						
CAPRINO	1	GGTGAGGACC	ATGTCGCTGT	TTACGTCACCT	TCCTTTTCTT	CTCCTGACTG	50
OVINO	1	-GTGAGGACC	ATGTCGCTGT	TTACATCACT	TCCTTTTCTT	CTCCTGACTG	50
BOVINO	1	-GTGAGGATC	ATGTCGCTGT	TTACATCACT	TCCTTTTCTT	CTCCTGACTG	50
	60	70	80	90	100		
CAPRINO	51	TGGTGACAGC	ATCTTGTGCA	GACACAGAAG	CAGAGAACTG	TGAGAATATC	100
OVINO	51	TGGTGACAGC	ATCTTGTGCA	GACACAGAAG	CAGAGAACTG	TGAGACTATC	100
BOVINO	51	CGGTGACAGC	ATCTTGTGCA	GACACAGAAA	CAGAGAACTG	TGAGAACATC	100

		110	120	130	140	150	
CAPRINO	101	CGGAAGACCT	GCCCCGTGAT	TGCCTGTGGT	CCTCCAGGCA	TCAACGGCTT	150
OVINO	101	CGGAAGACCT	GCCCCGTGAT	TGCCTGTGGT	CCTCCAGGCA	TCAACGGCTT	150
BOVINO	101	CGGAAGACCT	GCCCCGTGAT	TGCCTGTGGT	CCTCCGGGCA	TCAATGGCAT	150
		160	170	180	190	200	
CAPRINO	151	CCCAGGCAAA	GATGGGCGTG	ATGGTGCCAA	GGGAGAAAAG	GGAGAACCAG	200
OVINO	151	CCCAGGCAAA	GATGGGCGTG	ATGGTGCCAA	GGGAGAAAAG	GGAGAACCAG	200
BOVINO	151	CCCAGGCAAA	GATGGGCGTG	ATGGTGCCAA	GGGAGAAAAG	GGAGAACCAG	200
		210	220	230	240	250	
CAPRINO	201	gtacaggctg	ggctgttctt	tctctgcgac	tctttatctc	ccaaaggaaa	250
OVINO	201	gtacagtgtg	ggctgttctt	tctctgcgac	tctttatctc	ccaaaggaaa	250
BOVINO	201	gtacagtttg	ggctgttctt	tctctgcgac	t--ttatctc	ccaaagcaaa	250
		260	270	280	290	300	
CAPRINO	251	cgcctggat	tgaggagg	gtaatgcatt	catgacactt	gtattgctct	300
OVINO	251	cgcctggat	tgaggagg	gtaatgcatt	catgacactt	gtattactct	300
BOVINO	251	ctgcctggat	tgaggagg	gtaatgtatg	catgctgctt	gtattactct	300
		310	320	330	340	350	
CAPRINO	301	taactacata	ttatcatttg	aaacacagac	acggctctga	ttctggcatc	350
OVINO	301	taactacata	ttatcatttg	aaacagaggg	acggctctga	ttctggcatc	350
BOVINO	301	caaccacata	ttatcatttg	aaacagagat	acggctctga	ttctggcatc	350
		360	370	380	390	400	
CAPRINO	351	ccagactctc	acataggaac	tgctaacact	tggtggtcct	gcaggctcag	400
OVINO	351	ccagactctc	acacaggaac	tactaacact	tggtggtcct	gcaggctcag	400
BOVINO	351	ccagactctc	acacaggaac	tgctgacac	tggtggtcct	gccggctcag	400
		410	420	430	440	450	
CAPRINO	401	ggagttgacc	ctcaaggcag	accatccca-	-----	aggettttct	450
OVINO	401	ggagttgacc	ctcaaggcag	accatcccat	gggacttagg	aggettttct	450
BOVINO	401	ggagttgacc	ctcaagaca-	----tcccat	gggacatagg	aggettttct	450
		460	470	480	490	500	
CAPRINO	451	tctatgttcc	ttataaacag	cagctcagaa	aagttagccc	tagctcagtg	500
OVINO	451	tctatgttcc	ttacaaacag	cagctcagaa	aagttagccc	tagctcagtg	500
BOVINO	451	tctatgatcc	ttacaaacag	cagctcagaa	aagttaacc	tagctcagtg	500
		510	520	530	540	550	
CAPRINO	501	tctcctttcc	cctgggaagg	gattggacat	catatattttt	tgagaaatag	550
OVINO	501	tctcctttcc	cctgggaagg	gattgggcat	catatattttt	-gagaaatag	550
BOVINO	501	tctcctttcc	cctgggaagg	gattgggcat	catatattttt	tgagaaatag	550
		560	570	580	590	600	
CAPRINO	551	aaaaggaaca	caaataatga	gtcatgtttc	ctttttctc	caacagGTCA	600
OVINO	551	aaaaggaaca	caaataatga	gtcatgtttc	ctttttctc	caacagGTCA	600

Esone 2



BOVINO	551	aga-ggaaca caaatattga gtcattgtttc ctttttcttc caacagGTC	600
		610 620 630 640 650	
CAPRINO	601	AGGACTCAGA GGCTCGCAGG GCCCTCCTGG AAAGATGGGG CCTCAAGGAA	650
OVINO	601	AGGACTCAGA GGCTCGCAAG CCCCTCCTGG AAAGATGGGG CCTCAGGGAA	650
BOVINO	601	AGGACTCAGA GGCTCGCAGG GCCCCCTGG AAAGATGGGG CCTCAAGGAA	650
		660 670 680 690 700	
CAPRINO	651	CACCAGGGAT CCCTGGGATA CCAGGACCAA CAGGCCAAAA AGGAGACCCT	700
OVINO	651	CACCAGGGAT CCCTGGGATA CCAGGACCAA CAGGCCAAAA AGGAGACCCT	700
BOVINO	651	CGCCAGGGAT CCCTGGGATA CCAGGACCAA TAGGCCAAAA AGGAGACCCT	700
		710 720 730 740 750	
CAPRINO	701	GGAGAAAATA TGGgtaagga gtttacttta gcaaggTCCA ggctgaggTC	750
OVINO	701	GGAGAAAATA TGGgtaagga gtttacttta gcaaggTCCA ggctgaagTC	750
BOVINO	701	GGAGAAAATA TGGgtaagga gtttacttta gcaaggGCCA ggctgaagTC	750
		760 770 780 790 800	
CAPRINO	751	ccctggggTC tgtgggctca agtatcatgt gggacatgcc ctttctgctg	800
OVINO	751	ccctggggTC tgtgggctca agtatcatgt gggacatgcc ctttctgctg	800
BOVINO	751	ccctggggTC tgtgggctca agtatcatgt gggacatgcc ctttctgctg	800
		810 820 830 840 850	
CAPRINO	801	cttcctgggg agatgcccaa ctctgcttcc tgactaagca gcctccagct	850
OVINO	801	cttcctgggg agatgcccaa ctctgcttcc tgactaagcc gcctccagct	850
BOVINO	801	cttcctgggg agatgcccaa ctctgcttcc tgactaagca gcctccagct	850
		860 870 880 890 900	
CAPRINO	851	tctgtaggtt acttagagcc tcaggcattc ctaccaattc ctgaatacag	900
OVINO	851	tctgtaggtt acttagagcc tcaggcattc ctaccaattc ctgaatacag	900
BOVINO	851	tctctaggtt acttagagcc tcaggggttc ctatcaattc ctgaatacag	900
		910 920 930 940 950	
CAPRINO	901	agtcacaaac agttcagagc caaacctca cgagatgcct gctggaggat	950
OVINO	901	agtcacaaac tgttcggagc caaaccttg tgagatgcct gctggaggat	950
BOVINO	901	agtcacaaac cgttcagagc caaacctcg ccagatgcct gctggaggat	950
		960 970 980 990 1000	
CAPRINO	951	ctgagccctg gctatccttc agctgaaca gtttggTCCA aaaggagaa	1000
OVINO	951	ctgagcc --- --- --- ---TCCA ---	1000
BOVINO	951	ctgagccctg gatatccttc aactgaaca atttgaTCCA aaaggagaa	1000
		1010 1020 1030 1040 1050	
CAPRINO	1001	tatatgtgtt gggcttatta tgctatttt tgcaagagcg gtagatacat	1050
OVINO	1001	----- --- --- ---gcaagagcg gtagatacat	1050
BOVINO	1001	tatatgcatt gggcttatta tgctatttt caacaagagtg gtagatacat	1050
		1060 1070 1080 1090 1100	
CAPRINO	1051	ggtatatcaa ttatctctta cttcatgaga aacaacacac agccatttat	1100

OVINO	1051	agtatgtcaa ttatctctta ctctcatgaga aacaacacac agccatttat	1100
BOVINO	1051	ggtatgtcaa ttatctctta ctctcatgaga aacaacacac agccatttat	1100
		1110 1120 1130 1140 1150	
CAPRINO	1101	ttaaatacaa attctgtgaa tcaaataatt tctttgctgg tctcagctgg	1150
OVINO	1101	ttaaatacaa attctatgaa tcaaataatt tctttgctgg tctcagctgg	1150
BOVINO	1101	ttaaatacaa attctgtgaa tcaaataatt tctttgctgg tctcagctgg	1150
		1160 1170 1180 1190 1200	
CAPRINO	1151	actcactcgt gtgtcaactg gtggccaatg atctcactta cacactggct	1200
OVINO	1151	actcactcgt gtgtcaactg gtggccaatg gtctcactta cacactggct	1200
BOVINO	1151	agtcactcat gtgt-----g gtctcacata catgttgct	1200
		1210 1220 1230 1240 1250	
CAPRINO	1201	attgtgcacc catcagctgg agtgatgaag gtgactgagc cacgggtctc	1250
OVINO	1201	attgtgcacc catgagctgg agtgatgaag gtgactgagc cacgggtctc	1250
BOVINO	1201	attgggcgcc cgtcagctgg agtgatgaag gtgcctgagc cgtgggtctc	1250
		1260 1270 1280 1290 1300	
CAPRINO	1251	tctcctcca -ttgactcac ctggccttaa tcacacagag gtgattacag	1300
OVINO	1251	tctcctcca gttgactcac ctggccttaa tcacacagag gtgattacag	1300
BOVINO	1251	tcatcctcca gttgactcac ctggccttaa tcacacagag gtgattacag	1300
		1310 1320 1330 1340 1350	
CAPRINO	1301	gattcacaag aaaaggaaga gcggaagggt taaggcctcc ttatggcttg	1350
OVINO	1301	gattcacaag aaaaggaaga gcggaagggt taaggcc-cc ttaaggcttg	1350
BOVINO	1301	gattcagatg aaaaggaaga gcggaagggt -aaggcctcc ttaaggcttg	1350
		1360 1370 1380 1390 1400	
CAPRINO	1351	ggatacatac actattgctt ctgctacatt gtattgatca -caca-gtca	1400
OVINO	1351	ggatacatac actattgctt ccaccadggt gtattgatca -caca-gtca	1400
BOVINO	1351	ggatacatac actattgctt ccgccadacc gtattggtca acacaagctc	1400
		1410 1420 1430 1440 1450	
CAPRINO	1401	ca-ggccagc tcagattcaa ggagtggg-a atagactcca tttcctaaga	1450
OVINO	1401	ca-ggccagc tcagatttaa ggagtggg-a atagactcca tttcctaaga	1450
BOVINO	1401	caaggccggc tcagattcaa ggagtgggga atagactcca tttcctcaga	1450
		1460 1470 1480 1490 1500	
CAPRINO	1451	gaagctgtat catatcaagg tcatttttgc catcagctac acatagcttg	1500
OVINO	1451	gaagctgtat catatcagg tcatttttgc catcaactac acatagcttg	1500
BOVINO	1451	gaagctgtgt catatcaagg tcatttttgc catcactac acatagcttg	1500
		1510 1520 1530 1540 1550	
CAPRINO	1501	tctcatgccc tccccatgg ataatggaca actcacagaa atcctagctt	1550
OVINO	1501	tctcatgccc tccccatgg ataatggaca actcacagaa atcctagctt	1550
BOVINO	1501	tctcatgccc tccccatgg ataatggaca actcacagaa atcctagctt	1550
		1560 1570 1580 1590 1600	

CAPRINO	1551	actgattaac aggacaaact cagggaaaaa caaacaacaa aatgaacaaa	1600
OVINO	1551	actgattaac aggacaaact cagggaaaaa caaacaacaa aatgaacaaa	1600
BOVINO	1551	actgattaac aggacaaact cagggaaaaa caaacaacaa aatgaataaa	1600
		1610 1620 1630 1640 1650	
CAPRINO	1601	aacaagacat gcccaaagat gaaactctgt agactttgta gtcaatattc	1650
OVINO	1601	accaagacat gcccaaagat gaaactctgt agactttata gtcaatattc	1650
BOVINO	1601	aacaaaacat cgccaaagat gaaactctgt agactttaca gtcaggattc	1650
		1660 1670 1680 1690 1700	
CAPRINO	1651	accagctcat aataattcct caattagttt attccaacat tttgtccatg	1700
OVINO	1651	accagctcat aatcattcct caattagttt attccaacat tttgtccatg	1700
BOVINO	1651	accagctcat aataattcct ccatcagttt gttccagaat tttgtccatg	1700
		1710 1720 1730 1740 1750	
CAPRINO	1701	atagagctat ttgtttggag aaataaaacc attagtgagt agcttggcat	1750
OVINO	1701	atagagctat ttgtttggag aaataaaaca attagtgagt agcttggcat	1750
BOVINO	1701	atagagctat ttgtttggag aaataaaaca attagtgact agcttggcat	1750
		1760 1770 1780 1790 1800	
CAPRINO	1751	gtggagagct ataatactat tgacagatca acagggagtg tgtgtatgtg	1800
OVINO	1751	gtggagagct ataatgctat taacagatca acagggagtg tgtgtatgtg	1800
BOVINO	1751	gtggagagct ataatgctat taacagatca acagggagtg tatgtatgtg	1800
		1810 1820 1830 1840 1850	
CAPRINO	1801	cggtgtgtg tgccgatgta tgtgtctata aagtgtctt acgtacattc	1850
OVINO	1801	cggtgtgtg cgtg-atgta tgtgtctata aagtgtctt acatacattc	1850
BOVINO	1801	--tatgtgtg tgggaatgta tgtgtctata aagtgtctt acatacattc	1850
		1860 1870 1880 1890 1900	
CAPRINO	1851	aacagaggaa gagtcatggt gttgggttag atggaataa agacaatttt	1900
OVINO	1851	aacagaggaa gagtcatcct -ttgggttag atggaataa agacaatttt	1900
BOVINO	1851	aacagatgaa gagtcatggt -ttgggttag atggaataa agacaatttt	1900
		1910 1920 1930 1940 1950	
CAPRINO	1901	ccttcttttc gcttcttgta ttttttctt ttttt-cca aagaa-caaa	1950
OVINO	1901	ccttcttttc gcttcttg-a ttttttctt ttttttcca aagaaacata	1950
BOVINO	1901	ccttcttttc gcttcttg-a ttttttcat ttttttct-- aaagagcaaa	1950
		1960 1970 1980 1990 2000	
CAPRINO	1951	tatcaatata aaataaactt ttaatttaaat ttaatttttt tta---gttt	2000
OVINO	1951	tatcaatata aaataaactt ttaatttcat ttaatttttt ttat--gttt	2000
BOVINO	1951	tatcaatata aaataaactt ttaattttat ttattttttt tttttagt	2000
		2010 2020 2030 2040 2050	
CAPRINO	2001	caaaaggtaac cctaccocct tatagttcta ag-ataactt cttacaaca	2050
OVINO	2001	caaaaggtaac cctaccocct tatagttcta agtataactt cttacaaca	2050
BOVINO	2001	caaaaggtaac cctaccocct tatagttcta ag-ataactt tttacaaca	2050

		2060	2070	Esone 2080 3	2090	2100	
CAPRINO	2051	ctctttcact	taatttctta	gGTGACTATA	TTAAACTGGC	TACTTCAGAA	2100
OVINO	2051	ctctttcact	taatttctta	gGTGACTATA	TTAAACTGGC	TACTTCAGAA	2100
BOVINO	2051	ctctttcact	taatttctta	gGTGACTATA	TTCGCCTGGC	TACTTCAGAA	2100
		2110	2120	2130	2140	2150	
CAPRINO	2101	ACAGCAAGC	TACAATCTGA	ATTGAACCAG	ATCAAAAAC	gtaagccttc	2150
OVINO	2101	ACAGCAACTC	TACAATCTGA	ATTGAACCAG	ATCAAAAAC	gtaagccttc	2150
BOVINO	2101	AGAGCAACTC	TACAATCTGA	ATTGAACCAG	ATCAAAAAC	gtaagccttc	2150
		2160	2170	2180	2190	2200	
CAPRINO	2151	tctcttttca	ggcagctga	agtttggtaa	agtgaagac	aacatttatt	2200
OVINO	2151	tctcttttca	ggcagctga	agtttggtaa	agtgaagac	aacatttatt	2200
BOVINO	2151	tctcttttca	ggcagcttga	agtttggtaa	agtgaagac	aacagtatt	2200
		2210	2220	2230	2240	2250	
CAPRINO	2201	gaatatattt	aattttctag	tacctggata	ggtgtctatt	catattctgg	2250
OVINO	2201	gaatatattt	aattttctag	tacctggata	ggtgtctatt	catattctga	2250
BOVINO	2201	gaatatattt	aattttctag	tacctggata	ggtgtctatt	catattctga	2250
		2260	2270	2280	2290	2300	
CAPRINO	2251	tttcatgaaa	tcttcacaac	aacttttggt	agaaatgaag	gcaaagaaaa	2300
OVINO	2251	tttcatgaaa	tcttcacaac	aacttttggt	agaaatgaag	gcaaagacaa	2300
BOVINO	2251	tttcatgaaa	tcttcaca--	aacttttggt	agaaatgaag	gcaaagaaaa	2300
		2310	2320	2330	2340	2350	
CAPRINO	2301	agtacataat	ttgctcaaaa	gcatagaact	catgagtagc	agagccactt	2350
OVINO	2301	agtacataat	ttgctcaaac	gcatagaact	aatgagtagc	agagccactt	2350
BOVINO	2301	agtacataat	ttgctcaaaa	gcatagaact	aatgagtagc	agagcaactt	2350
		2360	2370	2380	2390	2400	
CAPRINO	2351	ataaactgaa	gtcagctctga	taccagagag	ggctaccag	gtggctcagt	2400
OVINO	2351	ataaactgaa	gtcagctctgg	taccagagag	ggctaccag	gtggctcagt	2400
BOVINO	2351	ataaacttta	gtcagctctga	taccagagag	ggctaccag	gtagctcagt	2400
		2410	2420	2430	2440	2450	
CAPRINO	2401	gccaattggc	accagggtgc	ccatgcag--	-atataggcg	acgcagggttt	2450
OVINO	2401	gccagttggc	accagggtgc	cagtgtagga	gatgtaggag	acgcagggttt	2450
BOVINO	2401	ggtaaacat-	tccatcttgc	caatgcagga	gatgtaggag	acgcagggttt	2450
		2460	2470	2480	2490	2500	
CAPRINO	2451	gatccctggg	ttgggaagat	ccctggagt	aggaaatggc	aaccoattte	2500
OVINO	2451	gatccctggg	ttgggaagat	ccctggagt	aggaaatggc	aaccoattte	2500
BOVINO	2451	gatccctggg	ttgggaagat	ccctggagt	aggaaatggc	aaccoacttc	2500
		2510	2520	2530	2540	2550	
CAPRINO	2501	agtattcttg	cctggaaaat	cccatggaca	gaggagccca	gagggttget	2550
OVINO	2501	agtattcttg	cctggaaaat	tccatggaca	gaggagcccg	gagggttget	2550

BOVINO	2501	agtattcttg cctgaaaat tccatggaca gaggagcccg gcgggttgca	2550
		2560 2570 2580 2590 2600	
CAPRINO	2551	atccatgggg cctcaaagag tcagacacga ctgacc-aaa tgagcatcca	2600
OVINO	2551	atccatgggg cctcaaagag tcagacacga ctgacc-aaa tgagcatcca	2600
BOVINO	2551	atctatgggg cctcaaagag tcagacacag ctgacc-aaa tgagcatcca	2600
		2610 2620 2630 2640 2650	
CAPRINO	2601	tgctgctaa taccagagac cdtgattctg cttcttcacg ttacagtgca	2650
OVINO	2601	tgctgctat taccagagac cdtgattctg cttcttcacg ttacagtaca	2650
BOVINO	2601	tgcatgctaa taccagagac cdcgattctg cttctttata tcacagtgta	2650
		2660 2670 2680 2690 2700	
CAPRINO	2651	cagtgtacat agaggtcact gaaaatggga ccg---acac ctcttccct	2700
OVINO	2651	cagtgtacat agaggtcact gaaaatggga ccaccaacac ctcttccct	2700
BOVINO	2651	cagtgtacat acaggtcact gaaaatggg- ---caa-ac ctcttccct	2700
		2710 2720 2730 2740 2750	
CAPRINO	2701	ttgttatgct ggtgctgaga actggcagtg gggc-ttaacc tgttgcttg	2750
OVINO	2701	ttgttatgct ggtgctgaga actggcagtg gggc-ttaacc tgttgcttg	2750
BOVINO	2701	ttgttacgct ggtcctgaga actggcaatg ggg-ttaacc tgttacttg	2750
		2760 2770 2780 2790 2800	
CAPRINO	2751	cctgagacaa atattctaag aaatttacct gtatttatgt taatattggg	2800
OVINO	2751	cctgagacaa atattctaag aaatttacct ttatttatgt taatattggg	2800
BOVINO	2751	cctgagacaa atattctaag acatttacct ttatttatgt tactattggg	2800
		2810 2820 2830 2840 2850	
CAPRINO	2801	gtaaaactta gaattccaaa ttatgtgtat tctagaatat ggtccaaaga	2850
OVINO	2801	gtaaaactta gaattccaaa ttatgtgtat tctagaatat ggtccaaaga	2850
BOVINO	2801	gtaaaactta gaactctaaa ttatgtgtgt tctagaatat ggtccaaaga	2850
		2860 2870 2880 2890 2900	
CAPRINO	2851	gacaaaggcc ttgttccag ttcatctggt cagattaggg ctgctagatt	2900
OVINO	2851	gacaaaggcc ttgttccag ttcatctggt cagattaggg ctgctagatt	2900
BOVINO	2851	gacaaaggcc ttgttccag tccatctggt cagattaggg ctgctagact	2900
		2910 2920 2930 2940 2950	
CAPRINO	2901	taaccaaaaa aagg-ttact gagtt-aaat ctgaatttca ggtaacaac	2950
OVINO	2901	taaccaaaaa aagg-ttact gagtt-aaat ctgaatttca ggtaacaac	2950
BOVINO	2901	taaccagaaa aaagcttact gagtt-aaat ctgaatttca ggtaacaac	2950
		2960 2970 2980 2990 3000	
CAPRINO	2951	ag-aatTTTT ttTggggggg gggTatatgt atgtcctaaa aactgcataT	3000
OVINO	2951	ag-gatTTTT ttctTTTTTT ttggTatatgt atgtcctaaa aactgcataT	3000
BOVINO	2951	agcaatTTTT ttatTTTTTT ttggTatatgt atatcctaaa aactgcataT	3000
		3010 3020 3030 3040 3050	
CAPRINO	3001	gagatcttta tactaaaatt tttttttaa tcc-actgct tttctataat	3050

OVINO	3001	gagatcttta	tactaaat	ttttt	taaaa	tccc	actgct	tttctataat	3050		
BOVINO	3001	gagatcttta	aactaaat	ttttt	aaa	tcc	actgct	tttctataat	3050		
		3060	3070	3080	3090	3100					
CAPRINO	3051	tcaaagttaa	ctggacatac	catat	ttttat	gtggc	atctg	tactatagaa	3100		
OVINO	3051	tcaaagttaa	ctggacatac	catat	ttttat	gcggc	atctg	tactatagaa	3100		
BOVINO	3051	tcaaagtcaa	ct-----	ac	catat	ttttat	gtggc	atctg	3100		
		3110	3120	3130	3140	3150					
CAPRINO	3101	actttcatcc	agaaaaat	at	cttggg	ctgg	acttag	agac	aaaccg	gtgc	3150
OVINO	3101	actttcatcc	agaaaaat	at	cttggg	ctgg	acttag	agac	aaaccg	gtgc	3150
BOVINO	3101	actttcatcc	agaaaaat	at	cttggg	ctgg	acttag	aaac	aaacc	atgtc	3150
		3160	3170	3180	3190	3200					
				Esone 4							
CAPRINO	3151	ccctatattt	tcccatttta	gGGCTAATCT	TCTCTCTGGG	CAAAA	AAGTT		3200		
OVINO	3151	ccctatattt	tcccatttta	gGGCTAATTT	TCTCTTTGGG	CAAAA	AAGTT		3200		
BOVINO	3151	atctatattt	tcccatttta	gGGCTAATCT	TCTCTCTGGG	CAAAA	GAGTT		3200		
		3210	3220	3230	3240	3250					
CAPRINO	3201	GGGAAGAAGA	TATTTTTTAC	CAATGGTAAA	AAGATGCCTT	TTAATGAAGT			3250		
OVINO	3201	GGGAAGAAGA	TATTTTTTAC	CAACGGTAAA	AAGATGCCTT	TTAATGAAGT			3250		
BOVINO	3201	GGGAAGAAGG	CATTTTTTAC	CAATGGTAAA	AAGATGCCTT	TTAATGAAGT			3250		
		3260	3270	3280	3290	3300					
CAPRINO	3251	GAAGACTCTG	TGTGCACAGT	TCCAGGGCCG	TGTGGCCACC	CCTATGAATG			3300		
OVINO	3251	AAAGACTCTG	TGTGCACAGT	TCCAGGGCCG	TGTGGCCACC	CCTATGAATG			3300		
BOVINO	3251	GAAGACTCTG	TGTGCACAGT	TCCAGGGCCG	TGTGGCCACC	CCTATGAATG			3300		
		3310	3320	3330	3340	3350					
CAPRINO	3301	CTGAAGAAAA	CAGGGCCCTC	AAGGATTCA	TCACTGAAGA	GGCTTTCCTG			3350		
OVINO	3301	CTGAAGAAAA	CAGGGCCCTC	AAGGATTTG	TCACTGAAGA	GGCTTTCCTG			3350		
BOVINO	3301	CTGAAGAAAA	CAGGGCCCTC	AAGGATTAG	TCACTGAAGA	GGCTTTCCTG			3350		
		3360	3370	3380	3390	3400					
CAPRINO	3351	GGCATCACAG	ATCAGGAGAC	TGAAGGCCAG	TTTATGGATC	TGACAGGAA			3400		
OVINO	3351	GGCATCACAG	ATCAGGAGAC	TGAAGGCCAG	TTTATGGATC	TGACAGGAA			3400		
BOVINO	3351	GGCATCACAG	ATCAGGAGAC	TGAAGGCAAA	TTTGTGGATC	TGACAGGAAA			3400		
		3410	3420	3430	3440	3450					
CAPRINO	3401	CAGGGTGACC	TACCAAACT	GGAATGACGG	CGAGCCTAAC	AATGCTTCTC			3450		
OVINO	3401	GAGGGTGACC	TACCAAACT	GGAATGACGG	CGAGCCTAAC	AATGCTTCTC			3450		
BOVINO	3401	GGGGTGACC	TACCAAACT	GGAATGATGG	CGAGCCTAAC	AACGCTTCTC			3450		
		3460	3470	3480	3490	3500					
CAPRINO	3451	CTGGGGAGCA	CTGTGTGACA	CTCCTGTCGG	ATGGCACATG	GAATGACATC			3500		
OVINO	3451	CTGGGGAGCA	CTGTGTGACC	CTCCTGTCGG	ACGGCACATG	GAATGACATC			3500		
BOVINO	3451	CTGGGGAGCA	CTGTGTGACA	CTTCTGTCGG	ACGGCACATG	GAATGACATC			3500		
		3510	3520	3530	3540	3550					


```

CAPRINO      3501 GCTTGTCCG CCTCCTATTT GACTGTCTGT GAATTCTCCA TCTGAGGGGG      3550
OVINO       3501 GCTTGTCCG CCTCCTACTT GACTGTCTGC GAATTCTCCA TCTGAGGGGG      3550
BOVINO      3501 GCTTGTCCG CCTCCTTTT GACCGTCTGT GAATTCTCTC TCTGAGGGAG      3550
           3560      3570      3580      3590      3600
CAPRINO      3551 GCAGAGACCT GCAGTCCTCC -GTTCC-GTA TGCTACTCTA .....      3600
OVINO       3551 -CATGAGCCT -CAGTCCTCC .....      3600
BOVINO      3551 A-ATGAGCCT AAAGTCCTCC TGTTCCTTTA CTCATCTCAT .....      3600

```

Fig. 5. Omologia tra le sequenze nucleotidiche comprese tra il 1° nucleotide del 1° esone al 417° nt del 4° esone del gene MBL caprino, ovino e bovino. I trattini rappresentano i nucleotidi deleti, mentre, i puntini quelli mancanti. Le lettere maiuscole e minuscole rappresentano rispettivamente gli esoni e gli introni. In grigio sono evidenziati i nucleotidi uguali nelle diverse specie.

4.2 Analisi delle regioni introniche

Sono stati sequenziati i 3 introni del gene dell'MBL per un totale di 2751 nucleotidi per ciascuna delle 3 capre esaminate. L'analisi ed il confronto delle sequenze ha messo in evidenza un totale di 6 siti polimorfici: 4 transizioni e 2 trasversioni (tabella 6). Nessuna delle mutazioni evidenziate sembrerebbe poter essere responsabile di differenze nell'espressione del gene dell'MBL poiché nessuna di esse, apparentemente, va ad alterare siti canonici di splice.

REGIONE	POSIZIONE	MUTAZIONE
Introne 1	52° nt	C → T
	164° nt	T → C
Introne 2	190° nt	T → G
	266° nt	C → T
	1237° nt	T → G
Introne 3	290° nt	A → G

Tab. 6. Polimorfismi intronici. La posizione è riferita al primo nucleotide dell'introne considerato

Il confronto delle sequenze dell'MBL caprino con l'omologo gene nella specie ovina e bovina ha messo in evidenza un'inserzione e due delezioni che sembrerebbero specifiche della capra.

L'inserzione si realizza per 11 nucleotidi tra il 230° e il 240° nt del 1° introne (TGGGACTTAGG), le delezioni consistono di 29 bp tra i nucleotidi 245 e 273 (CTGGCTATCCTTCAGCTGAAACAGTTTGG) e di 41 bp tra il 278° e il 318° nt (AAAGGGAGAATATATGTGTTGGGCTTATTATGCCTATTTTT) del 2° introne.

Inoltre, al 3° introne è presente uno stretch di otto guanine nella capra vs otto timine nella pecora e nel bovino. Nessuna inserzione di origine retroposonica sembrerebbe interessare il gene MBL nella specie caprina.

4.3 Analisi delle regioni esoniche

Sono stati sequenziati i 3 esoni del gene più 417 nt del 4° esone per un totale di 803 nucleotidi. Il confronto tra le sequenze relative alle regioni esoniche ha evidenziato una mutazione (una transizione G→ A) al 116° nucleotide del 2° esone. Tale mutazione è di tipo non conservativo in quanto è responsabile di un cambiamento amminoacidico (ATG^{met} →ATA^{ile}) (Figura 6).

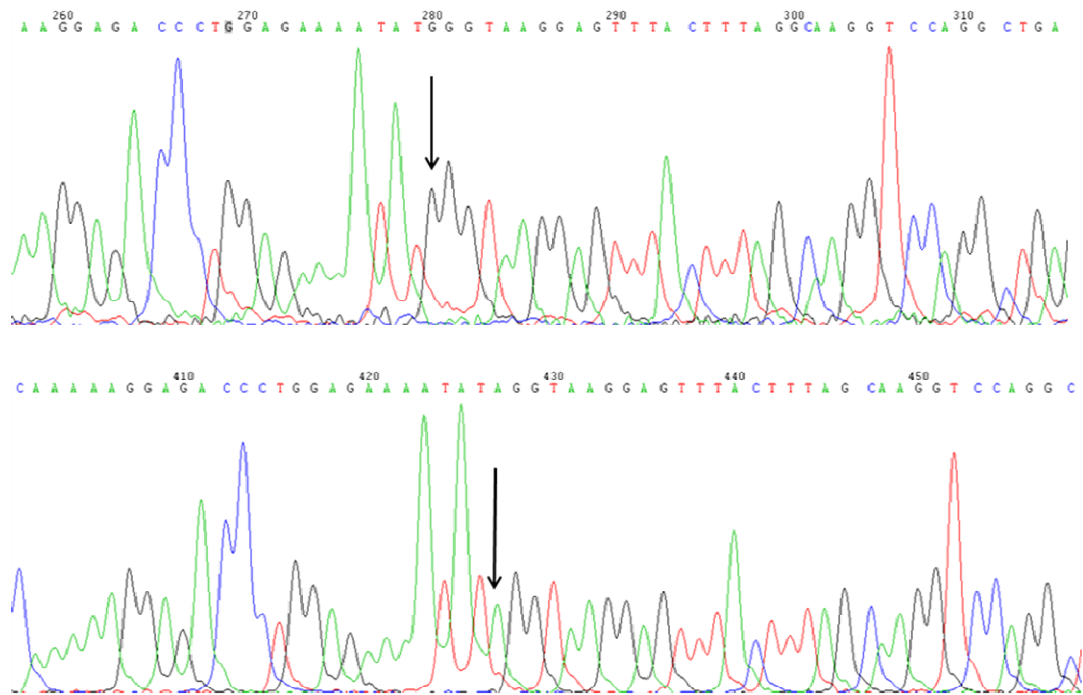


Fig.6. Elettroferogrammi della regione compresa tra il 2° esone e il 2° introne del gene MBL caprino

La presenza della G al 116° nucleotide al 2° esone caratterizza anche il gene MBL ovino e bovino; pertanto, è da ritenersi che la sua presenza possa rappresentare la condizione ancestrale.

4.4 Analisi del promotore

Sono stati sequenziati 961 nt del promotore. L'analisi strutturale ha evidenziato la presenza di diversi elementi regolatori: TATA-box (ATAAA) e CCAAT-box (CCAAAT) in posizione, rispettivamente, -49 nt e -140 nt, indicando con +1 il primo nucleotide del primo esone. Inoltre è stato individuato un sito di legame per il fattore glucocorticoid responsive element (GRE), in posizione -765 (AGATCAGA).

Il confronto delle sequenze della regione promotrice del gene MBL tra le 3 capre esaminate ha evidenziato 5 siti polimorfici: 1 trasversione e 4 transizioni (Tabella 7).

REGIONE	POSIZIONE	MUTAZIONE
<i>Promotore</i>	- 62° nt	C → A
	- 687° nt	C → T
	- 802° nt	G → A
	- 843° nt	T → C
	- 892° nt	G → A

Tab. 7. Polimorfismi della regione promotrice. La posizione è riportata prendendo quale riferimento numerico (+1) il 1° nucleotide del 1° esone

L'analisi per mezzo del programma on-line AliBaba v2.1 (<http://www.gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html>) ha messo in evidenza che nessuna di tali mutazione crea o altera putativi siti di legame per fattori di regolazione dell'espressione genica (Figura 7).

	10	20	30	40	50		
CAPRINO	1	50	
OVINO	1	50	
BOVINO	1	gcctgtga	gtactttggt	aaatgatct	gggtcctgg	gtcatatagt	50
	60	70	80	90	100		
CAPRINO	51	100	
OVINO	51	ggctgg	ctgatctg	100	
BOVINO	51	tagcgcttg	acttgatctt	ggaggcctat	aagagacttt	ctggagtggg	100
	110	120	130	140	150		
CAPRINO	101	aggaggtgg	gagaggcaa	gtagaatcca	tgctgcagtg	tctctttctc	150

OVINO	101	gagaggtgag gagaggca-	gtagaatcca tgctggagtg tctattttc	150			
BOVINO	101	gggaggtggg gagaggcaa	gtagaagcca tgctggagtg tctctttctc	150			
		160	170	180	190	200	
CAPRINO	151	tgcttatgct ggggcatctg	aaactttcct ggattcacct aaacatttgc	200			
OVINO	151	tgtttatgct ggggcatctg	gaactttcct ggattcacct aaacatt-gc	200			
BOVINO	151	tgcttatgct ggggcatctg	gaacttttct ggattcacct gaacatttgc	200			
		210	220	230	240	250	
CAPRINO	201	aaatgagact gtacctttgc	tttcaaagag agccaaga-- -----cct	250			
OVINO	201	aaatgagact gtacctttgt	tttcaaagag agccaaga-- -----cct	250			
BOVINO	201	aaatgagatt gtacctttgt	tttcaaagag agccaagagg gactagatcc	250			
		260	270	280	290	300	
CAPRINO	251	tggttcctgg gatgctgagg	tttccttggg gagggacatc tagaaaagaa	300			
BOVINO	251	tggttcctgg gctgctgagg	tttcctgggg gagggacgtc tagaaaacaa	300			
OVINO	251	tggttcctgg gatgctgagg	tttccttggg gagggacatc tagaaaagaa	300			
		310	320	330	340	350	
CAPRINO	301	ctttgagat cagatgaaat	gtagcatta aaaaatgaga agggatttca	350			
OVINO	301	ctttgagat cagatgaaat	gtaggatta aaaaatgaga agggatttca	350			
BOVINO	301	ctttgagat cagatgaaat	gtaggattg aaaaatgaga agggatttca	350			
		360	370	380	390	400	
CAPRINO	351	aggaatattg ccagtgatct	cgacatataa gacatgcaga acacctgtca	400			
OVINO	351	aggaacattg ccagtgatct	cgacatataa gacacgcaga acacctgtca	400			
BOVINO	351	aggaatattg ccagtgatct	tgacatatag ga----- atacctgcc	400			
		410	420	430	440	450	
CAPRINO	401	ggaaatagag agggatctag	cttcctgcct gggctaagag agtgagaaat	450			
OVINO	401	ggaaatagag agggatctag	catcctgcct gggctaagag agtgaataat	450			
BOVINO	401	ggaaatagag agggatctag	catcctgcct gggctaagac agtgagaaat	450			
		460	470	480	490	500	
CAPRINO	451	ttccagagaa aattctcccc	ctggcaagtc tttcttcag tgagaaataa	500			
OVINO	451	ttccagagaa aattctcccc	ctggcaagtc tttcttcag tgagaaagaa	500			
BOVINO	451	ttccagagaa aattctcccc	ctggcaagtc tttcttcag tgagaaacaa	500			
		510	520	530	540	550	
CAPRINO	501	acatcaagag aaagcaaact	caagttatt gtggctgggt tagtaactag	550			
OVINO	501	acatcaagag aaagcaaact	caagttatt gtggctgggt tagtaactag	550			
BOVINO	501	acatcaagag aaagcaaact	caagttagt gtggctgggt tagtaactag	550			
		560	570	580	590	600	
CAPRINO	551	cagtgactct tcctctctgg	atcattagct tgcagctcag tgcctgccgc	600			
OVINO	551	cagtgactct tcctctctgg	atcattagct tgcagctcag tgcctgccac	600			
BOVINO	551	tagtgactct tcctctctgg	atcattagct cgcagctcag tgcctgccac	600			

		610	620	630	640	650	
CAPRINO	601	tgagtagatg	ttggttatct	-ggcactgag	ggcaaaggac	tgtccagata	650
OVINO	601	tgagtagatg	ttggttatct	tgacactgag	ggcaaaggac	tatccagata	650
BOVINO	601	tgagtagatg	ttggttatct	-ggcactgag	ggcaaaggac	tgtccagata	650
		660	670	680	690	700	
CAPRINO	651	taaggatggg	atgcaggtgg	cagtagggcc	caagtgggag	aagtgcaaga	700
OVINO	651	ttaggatggg	atgcaggtgg	cagtagggcc	-aagtgggag	aagtgcaaga	700
BOVINO	651	taaggatggg	atgcaggtag	cagtagggcc	caagtgggag	aagtgcaaga	700
		710	720	730	740	750	
CAPRINO	701	gcaagcagg	tctccattca	tgattactcc	ctaagccagc	aggcatgagt	750
OVINO	701	gcaagctagg	tctccattta	tgattactcc	ctaagccagc	aggcatgagt	750
BOVINO	701	gcaagctagg	tctccattca	cgattactcc	ctaagccagc	aggcatgagt	750
		760	770	780	790	800	
CAPRINO	751	ctctggccat	gagtatgcct	atttgcctct	gcaaaggaca	cagagaacat	800
OVINO	751	ctctggccat	gagtatgcct	atttgcctct	gcaaaggaca	cagagaacat	800
BOVINO	751	ctctggccat	gagtatgcct	atttgcctct	gcagaggaca	cagagaacat	800
		810	820	830	840	850	
CAPRINO	801	aatcagagat	ttotgcagta	acaccagagg	acaggcaccg	gtgactcctt	850
OVINO	801	aatcagagat	ttotgcagta	acaccagagg	acaggcaccg	gtggctcctt	850
BOVINO	801	aatcagagat	ttotgcagta	acaccagagg	acaggcactg	gtgactcatt	850
		860	870	880	890	900	
CAPRINO	851	cctctcaaca	atgcaattat	ttatgtctac	ctttgttgaa	gtattaatta	900
OVINO	851	cctctcaaca	atgcagttat	ttatgtctac	ctttgttgaa	gtattaatta	900
BOVINO	851	cctctcaaca	atgcaattat	ttacatccac	ctttgttgaa	gtattaatta	900
		910	920	930	940	950	
					CCAAT-BOX		
CAPRINO	901	accagtgtca	ttgaaggatt	tattaataca	tttccaat	cccagtttgg	950
OVINO	901	accagtgtca	ttgaaggatt	tattaataca	tttccaat	cccagtttgg	950
BOVINO	901	accagtgtca	ttgaagaatg	tattaataca	tttccaat	cccagtttgg	950
		960	970	980	990	1000	
CAPRINO	951	aggccaggaa	tggatatcc	atctctacat	cacatgtgcc	cagtataggt	1000
OVINO	951	aggccaggaa	tggatatcc	atctctacat	cacatgtgcc	cagtataggt	1000
BOVINO	951	aggccaggaa	tggactatcc	atctctacat	cacatgtgcc	cagt-taggt	1000
		1010	1020	1030	1040	1050	
				TATA-BOX			
CAPRINO	1001	tataagctca	ataaatatgt	gtagataaag	agaacaagat	gagatcatct	1050
OVINO	1001	tataagctca	ctaaatatgt	gtagataaag	agaacaagat	gagatcacct	1050
BOVINO	1001	tataggttca	gtaaatacgt	gtagataaag	agaacaagat	gagataatct	1050
		1060	1070	1080	1090	1100	
				+1			
CAPRINO	1051	tccttgactt	ttottacacc	a-ggtgagg	accatgtcgc	tgtttacgtc	1100
OVINO	1051	tccttgactt	ttottacacc	aag-gtgagg	accatgtcgc	tgtttacatc	1100

Fig. 7. Omologia tra le sequenze nucleotidiche della regione promotrice del gene MBL caprino, ovino e bovino. I trattini rappresentano i nucleotidi deleti, mentre, i puntini quelli mancanti. Le lettere maiuscole e minuscole rappresentano rispettivamente la regione promotrice e l'esone 1. I siti putativi riconosciuti da fattori di trascrizione sono boxati e in grigio sono evidenziati i nucleotidi uguali nelle diverse specie.

4.5 Scelta dei marcatori da utilizzare per l'associazione con la *Brucella melitensis*

Al fine di verificare se esista o meno un'associazione tra i marcatori individuati e la resistenza alla *Brucella melitensis*, sono state scelte 5 mutazioni su un totale di 12 osservate.

In particolare, la scelta è ricaduta sulla transizione al 116° nucleotide del 2° esone per il quale è stata messa a punto una specifica metodica basata sulla ACRS e sulla trasversione T → G in posizione 190 del secondo introne per la quale è stata settata una PCR-RFLP. I restanti tre marcatori sono stati scelti a livello del promotore (-892, -802 e -62) con l'assunto che tale regione rivesta un ruolo cruciale nella regolazione dell'espressione del gene e la tipizzazione degli individui per tali marcatori è stata commissionata alla ditta KBiosciences (Herts, UK, <http://www.kbioscience.co.uk>)

4.6 ACRS-PCR (Amplification Created Restriction Site PCR) al 2° esone

Al fine di individuare in modo rapido ed economico i portatori della transizione G→A al 116° nucleotide del secondo esone è stata messa a punto una metodica basata sulla ACRS-PCR (Amplification Created Restriction Site PCR), realizzata modificando opportunamente un primer creando un terzo sito di restrizione per l'endonucleasi *Hsp92II* (CATG!) che include la mutazione. Il tratto amplificato ha una lunghezza di 117 bp comprendente parte del 2° esone e del 2° introne. Pertanto, la digestione con tale endonucleasi produce nei soggetti omozigoti per la presenza dell'adenina due frammenti di restrizione monomorfi di 9 bp e 21 bp (non evidenziabili elettroforeticamente) ed una banda polimorfa di 88 bp che, nei soggetti omozigoti per la guanina è digerita producendo due frammenti rispettivamente di 67 bp e 21 bp (non evidenziabile elettroforeticamente). Gli individui eterozigoti producono un pattern caratterizzato da tutti e 5 i frammenti di restrizione: 88, 67, 21, 21 e 9 bp (Figura 8)

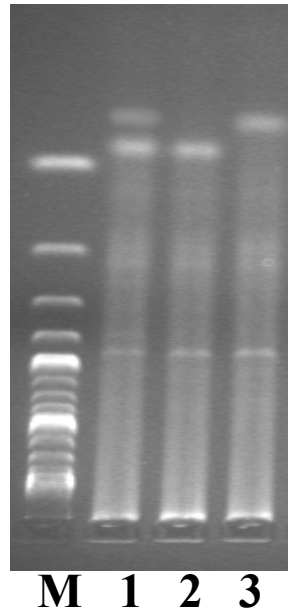
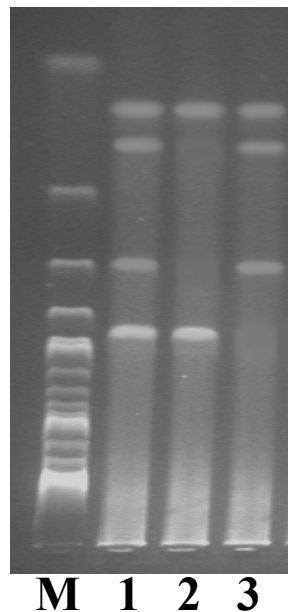


Fig. 8. Genotipo osservato dopo digestione con *Hsp92II* dei frammenti ottenuti mediante PCR. Pattern 1: MBL G/A; pattern 2: MBL A/A; pattern 3: MBL G/G; M: marker 1000 bp.

4.7 PCR-RFLP al 2° introne

Al fine di individuare in modo rapido ed economico i portatori della trasversione T → G in posizione 190 al secondo introne è stata messa a punto una metodica basata sulla PCR-RFLP. A tal fine è stato amplificato il tratto di DNA che va dal nucleotide in posizione 236 del 1° introne al 344° nucleotide del 2° introne per un totale di 614 bp. La trasversione T → G in posizione 190 del secondo introne è responsabile della scomparsa di uno dei tre siti di restrizione dell'enzima *HinfI* (G!ANTC) all'interno del tratto amplificato. Pertanto, la digestione con tale endonucleasi produce nei soggetti omozigoti per la presenza della guanina due frammenti di restrizione monomorfi di 127 bp e 34 bp (quest'ultimo non evidenziabile elettroforeticamente) ed una banda polimorfa di 454 bp che, nei soggetti omozigoti per la timina è digerita

producendo due frammenti rispettivamente di 157 bp e 297 bp. Gli individui eterozigoti producono un pattern caratterizzato da tutti e 5 i frammenti di restrizione: 454, 297, 157, 127 e 34 bp (Figura 9)



*Fig. 9. Genotipo osservato dopo digestione con *HinfI* dei frammenti ottenuti mediante PCR. Pattern 1: MBL T/G; pattern 2: MBL G/G; pattern 3: MBL T/T; M: marker 1000 bp.*

4.8 Genotipizzazione delle mutazioni al promotore

Per le 3 mutazioni prese in esame nella regione del promotore (2 transizioni G→A rispettivamente in posizione -892 e -802 ed 1 trasversione C→A in posizione -62) la genotipizzazione dei 218 campioni di DNA caprino è stata realizzata presso il laboratorio della KBiosciences (Herts, UK, <http://www.kbioscience.co.uk>) applicando la metodica della AS-PCR.

4.9 Indagine di popolazione

L'indagine di popolazione è stata condotta su 218 campioni individuali di DNA ottenuti da capre allevate nella provincia di Catanzaro. Delle 5 mutazioni, 4 ($G \rightarrow A^{-892}$, $C \rightarrow A^{-62}$, $G \rightarrow A^{116ex2}$, $T \rightarrow G^{190int2}$) sono strettamente associate (fase *cis*) e, quindi, possono essere considerate come un unico *locus* biallelico: A e B. Le frequenze di tali alleli sono risultate rispettivamente pari a 0,7362 e 0,2638 con la seguente distribuzione genotipica: 119 A/A, 83 A/B, 16 B/B (Tabella 8). La popolazione in esame è risultata in equilibrio di Hardy-Weinberg (1 g/l, χ^2 : 0,08455116, $P > 0,05$).

L'indagine di popolazione relativa alla mutazione $G \rightarrow A^{-802}$ evidenzia una distribuzione genotipica al *locus* del gene MBL: 168 G/G, 47 G/A e 3 A/A con una frequenza allelica pari a 0,8784 (allele G^{-802}) e 0,1216 (allele A^{-802}). Anche per tale marcatore la popolazione in esame è risultata essere in equilibrio di Hardy-Weinberg (1 g/l, χ^2 : 0,019707059, $P > 0,05$).

Per il successivo studio di associazione è stata esclusa la mutazione $G \rightarrow A^{-802}$ in quanto presente con bassa frequenza nella popolazione esaminata.

		Locus 1				
		GG^{-892}	GA^{-892}	AA^{-892}		
Locus 4	$TT^{190int2}$	119	-	-	Locus 2	CC^{-62}
	$TG^{190int2}$	-	83	-		CA^{-62}
	$GG^{190int2}$	-	-	16		AA^{-62}
		GG^{116ex2}	GA^{116ex2}	AA^{116ex2}		
		Locus 3				

Tab. 8. Distribuzione genotipica dei 4 loci associati

4.10 Fenotipo

Il fenotipo per ciascun soggetto in esame è stato ottenuto attraverso la determinazione dell'attività antimicrobica verso la *Brucella melitensis in vitro*, sulla base della differenza tra il valore logaritmico ottenuto dalla conta delle colonie sviluppatesi su una piastra contenente siero sottoposto a trattamento termico per disattivare le proteine del sistema del complemento (siero non attivo) ed una contenente siero non sottoposto a trattamento (siero attivo).

I dati ottenuti su un totale di 218 sieri individuali di capra vanno da un minimo di 0,01, che indicherebbe la massima suscettibilità al patogeno ad un valore di 1,47 che rappresenterebbe, invece, la massima resistenza (Figura 10).

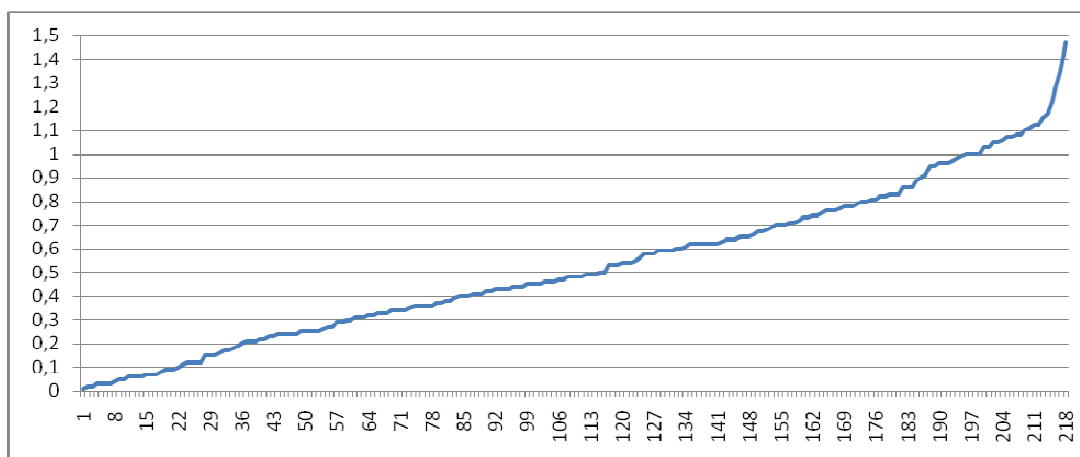


Fig. 10. Fenotipi ottenuti per mezzo della determinazione dell'attività antimicrobica verso *Brucella melitensis in vitro* di campioni individuali di siero caprino. Sulle acisse è riportato il numero dei singoli animali, mentre sulle ordinate il valore fenotipico ottenuto.

4.11 Correlazione Genotipo - Fenotipo

Per la realizzazione della correlazione sono state create due classi fenotipiche (0,01 a 0,74 e 0,75 a 1,47) e sono stati presi in esame i tre genotipi: AA, AB e BB.

I risultati ottenuti sono stati disposti in una tavola di contingenza (Tabella 9) ed elaborati utilizzando il programma statistico SAS (<http://support.sas.com/rnd/app/download.html>) al fine di individuare un valore dell'odds ratio che permetta di verificare un'eventuale associazione tra i genotipi e la resistenza alla *Brucella melitensis*. Il calcolo dell'odds ratio (OR) mostra un valore pari a 1,95 dal confronto dei soggetti aventi genotipo BB vs quelli non-BB (AA + AB), con limiti di confidenza al 95% compresi tra 0,43 e 8,9.

	SUSCETTIBILI	RESISTENTI
<i>BB</i>	14	2
<i>non-BB</i>	158	44

Tab. 9. Associazione tra il genotipo BB vs non-BB e la resistenza alla *Brucella melitensis*

Un tale valore di OR potrebbe far ipotizzare che un individuo omozigote BB abbia una suscettibilità alla brucellosi di circa 2 volte superiore rispetto a soggetti con genotipo AA o AB.

5. CONCLUSIONI

La brucellosi nella specie caprina è una zoonosi molto importante ed è oggetto in Italia di piani di controllo mirati dalla seconda metà degli anni sessanta.

Attualmente, su tutto il territorio nazionale è in vigore un piano di eradicazione obbligatorio, basato essenzialmente sul controllo sierologico periodico della popolazione caprina e sull'eliminazione dei capi sieropositivi. In tale piano la prova sierologica annuale di stalla assume il valore di verifica dei risultati dell'attività di sorveglianza, venendo tuttavia sostituita, dove possibile, da un controllo sierologico mediante ELISA sul latte di massa (ELISA-L), una tipologia da tempo validata e utilizzata anche in altri Paesi. Tutto ciò, unito all'applicazione dell'abbattimento totale nella maggior parte dei focolai, ha portato a circoscrivere l'epidemia nel patrimonio caprino. Poiché, l'abbattimento degli animali infetti insieme alla distruzione del latte contaminato comporta una notevole perdita economica per gli allevatori, potrebbe essere vantaggioso utilizzare strategie di selezione sia genetiche che fenotipiche al fine di ottenere individui che siano resistenti alla *Brucella melitensis*.

Gli studi di associazione genotipo/fenotipo rappresentano un valido strumento per l'identificazione di geni di resistenza. I dati riportati in questo studio sembrerebbero avvalorare l'ipotesi che il gene MBL possa ricoprire un

ruolo reale nella risposta dell'ospite alla *Brucella melitensis* anche nella specie caprina, analogamente a quanto già osservato per quella bufalina, suggerendo che gli individui aventi genotipo BB possano mostrare un certo svantaggio in termini di resistenza nei confronti di tale patogeno rispetto a soggetti con altri genotipi.

Ulteriori studi necessitano per avvalorare maggiormente tale ipotesi. In particolare, naturale proseguo della ricerca sarà quello di condurre nuovi studi di associazione genotipo/fenotipo partendo, però, da capre che siano infettate o meno (casi e controlli) dal patogeno *Brucella melitensis*, oltre che valutare l'effettivo livello della proteina della MBL nel siero degli stessi soggetti.

6. BIBLIOGRAFIA

Abbas A.K., Lichtman A.H., Pober J.S. (2002). Immunologia cellulare e molecolare. *Edizione Piccin.*

Adel S.A., Hamdy M.E.R., Ibrahim A.K. (2001). Detection of *Brucella melitensis* in semen using the polymerase chain reaction assay. *Veterinary Microbiology*, **82 (1)**: 37-44.

Alton G.G. (1990). *Brucella melitensis*, 1887 to 1987. In Animal Brucellosis, eds. Nielsen K. e Duncan J.R. *Edizione CRC Press Inc.*

Alton G.G., Jones L.M., Angus R.D., Verger J.M. (1988). Techniques for the brucellosis laboratory. *Edizione INRA.*

Andersen O., Friis P., Holm Nielsen E., Vilsgaard K., Leslie R.G., Svehag S.E. (1992). Purification, subunit characterization and ultrastructure of three soluble bovine lectins conglutinin, mannose-binding protein and the pentraxin serum amyloid P-component. *Scand. J. Immunol.*, **36 (1)**: 131-41.

Arnold R.R., Cole M.F., McGhee J.R. (1977). A bactericidal effect for human lactoferrin. *Science*, **197 (4300)**: 263-65.

Belli G. (2006). Elementi di patologia vegetale. *Edizione Piccin*.

Berczi I., Chow D.A., Sabbadini E.R. (1998). Neuroimmunoregulation and natural immunity. *Domestic Animal Endocrinology*, **15(5)**: 273-281.

Capparelli R., Iannaccone M., Palumbo D., Medaglia C., Moscariello E., Russo A., Iannelli D. (2009). Role played by human mannose-binding lectin polymorphisms in pulmonary tuberculosis. *J. Infect. Dis.*, **199 (5)**: 666-72.

Capparelli R., Parlato M., Amoroso M., Roperto S., Marabelli R., Roperto F., Iannelli D. (2008). Mannose-binding lectin haplotypes influence *Brucella abortus* infection in the water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Immunogenetics*, **60 (9)**: 157–165.

Carrère L., Lafenêtre H., Quatrefages H., Noronha (de) F., (1960). Durée de la survie des *Brucella* dans le fromage de Roquefort. *Bull. Acad. Vèt.*, **33**: 469-473.

Chen C.B. e Wallis R. (2004). Two mechanisms for mannose-binding protein modulation of the activity of its associated serine proteases. *J. Biol. Chem.*, **279 (25)**: 26058-65.

Davies G. e Casey A. (1973). The survival of *Brucella abortus* in milk and milk products. *Brit. Vet. J.*, **129 (4)**: 345-353.

Dlabac V. e Kawasaki N. (1994). Mannan-binding protein-like activity in the sera of new born piglets. *Immunobiology*, **190 (4-5)**: 399-410.

Dommet R.M., Klein N., Turner M.W. (2006). Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. *Tissue Antigens*, **68 (3)**: 193-209.

European Commission (2001). Brucellosis in sheep and goats: *Brucella melitensis* European report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare.

Fekete A., Bantle J.A., Halling S.M. (1992). Detection of *Brucella* by polymerase chain reaction in bovine fetal and maternal tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **4 (1)**: 79-83.

Hamdy M.E.R. e Adel S.A. (2002). Detection of Brucella Species in the Milk of Infected Cattle, Sheep, Goats and Camels by PCR. *The Veterinary Journal*, **163 (3):** 299-305.

Herman I. e Ridder H.D. (1992). Identification of Brucella spp. by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58 (6):** 2099-101.

Holmskov U., Holt P., Reid K.B.M., Willis A.C., Teisner B., Jensenius J.C. (1993). Purification and characterization of bovine mannan-binding protein. *Glycobiology*, **3 (2):** 147-53.

Ihara I., Harada Y., Ihara S., Kawakami M. (1982). A new complement-dependent bactericidal factor found in nonimmune mouse sera: specific binding to polysaccharide of Ra chemotype Salmonella. *J. Immunol.*, **128 (3):** 1256-60.

Ihara I., Ueda H., Suzuki A., Kawakami M. (1982). Physicochemical properties of a new bactericidal factor Ra-reactive factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **107 (4):** 1185-90.

Iobst S.T., Wormald M. R., Weis W. I., Dwek R. A., Drickamer K. (1994). Binding of sugar ligands to Ca(2+)-dependent animal lectins. I. Analysis

of mannose binding by site-directed mutagenesis and NMR. *J. Biol. Chem.*, **269** (22): 15505-11.

Kawasaki N., Kawasaki T., Yamashina I. (1983). Isolation and characterization of a mannan-binding protein from human serum. *J. Biochem.*, **94** (3): 937-47.

Kawasaki T., Etoh R., Yamashina I. (1978). Isolation and characterization of a mannan-binding protein from rabbit liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **81** (3): 1018-24.

Kerr M.A. (1980). The human complement system: assembly of the classical pathway C3 convertase. *Biochem. J.*, **189** (1): 173-81.

Kozutsumi Y., Kawasaki T., Yamashina I. (1980). Isolation and characterization of a mannan-binding protein from rabbit serum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **95** (2): 658-64.

Kozutsumi Y., Kawasaki T., Yamashina I. (1981). Kinetic properties of the serum mannan-binding protein from rabbit. A comparison with those of the liver mannan-binding protein. *J. Biochem.*, **90** (6): 1799-807.

Madsen H.O., Garred P., Kurtzhals J.A., Lamm L.U., Ryder L.P., Thiel S., Svejgaard A. (1994). A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. *Immunogenetics*, **40 (1):** 37-44.

Madsen H.O., Garred P., Thiel S., Kurtzhals J.A., Lamm L.U., Ryder L.P., Svejgaard A. (1995). Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. *J. Immunol.*, **155 (6):** 3013-20.

Maynard Y. e Baenziger J.U. (1982). Characterization of a mannose and N-acetylglucosamine-specific lectin present in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, **257 (7):** 3788-94.

Mogues T., Ota T., Tauber A.I., Sastry K.N. (1996). Characterization of two mannose-binding protein cDNAs from rhesus monkey (*Macaca mulatta*): structure and evolutionary implications. *Glycobiology*, **6 (5):** 543-50.

Mizuno Y., Kozutsumi Y., Kawasaki T., Yamashina I. (1981). Isolation and characterization of a mannan-binding protein from rat liver. *J. Biol. Chem.*, **256 (9):** 4247-52.

Müller-Eberhard H.J., Gallin I., Goldstein I.M., Snyderman R. (1988). Complement: Chemistry and pathways. *Raven Press*, 21-53.

Nicoletti P. (1989). Relationship between animal and human disease. In: Young E.J., Corbel M.J., eds: Brucellosis: clinical and laboratory aspects, *Edizione CRC Press Inc.*

Oka S., Ikeda K., Kawasaki T., Yamashina I. (1988). Isolation and characterization of two distinct mannan-binding proteins from rat serum. *Arch. Biochem. Biophys.*, **260 (1)**: 257-66.

Plommet M., Fensterbank R., Vassal L., Auclair J., Mocquot G. (1988). Survival of *Brucella abortus* in ripened soft cheese made from naturally infected cow's milk. *Le Lait*, **68**: 115-120.

Poli G. e Cocilovo A. (1996). Microbiologia e immunologia veterinaria. *Edizione UTET.*

Rother K., Till G.O., Hansh G.M. (1998). The complement system. *Edizione Springer.*

Sastry K., Herman G.A., Day L., Deignan E., Bruns G., Morton C.C., Ezekowitz R.A.B. (1989). The human mannose-binding protein gene. Exon structure reveals its evolutionary relationship to a human pulmonary surfactant gene and localization to chromosome 10. *Journal of Experimental Medicine*, **170 (4):** 1175-89.

Sastry K., Zahedi K., Lelias J.M., Whitehead A.S., Ezekowitz R.A. (1991). Molecular characterization of the mouse mannose-binding proteins. The mannose-binding protein A but not C is an acute phase reactant. *J. Immunol.*, **147 (2) :** 692-7.

Schwaeble W., Dahl M.R., Thiel S., Stover C., Jensenius J.C. (2002). The mannan-binding lectin-associated serine proteases (MASPs) and MASP-1: four components of the lectin pathway activation complex encoded by two genes. *Immunobiology*, **205 (4-5):** 455-66.

Storgaard P., Nielsen E.H., Andersen O., Skriver E., Mortensen H., Hojrup P., Leslie G., Holmskov U., Svehag S.E. (1996). Isolation and characterization of porcine mannan-binding proteins of different size and ultrastructure. *Scand. J. Immunol.*, **43 (8):** 289-96.

Sugii S. e Hirota Y. (1991). Identification and isolation of a bovine hepatic lectin reactive with N-acetylgalactosamine and/or galactose. *J. Vet. Med. Sci.*, **53 (5)**: 959-61.

Sumiya M., Super M., Tabona P., Levinsky R.J., Arai T., Turner M.W., Summerfield J.A. (1991). Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient children. *Lancet*, **337 (8757)**: 1569-70.

Thiel S., Vorup-Jensen T., Stover C.M., Schwaeble W., Laursen S.B., Poulsen K., Willis A.C., Eggleton P., Hansen S., Holmskov U., Reid K.B.M., Jensenius J.C.(1997). A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature*, **386 (6624)**: 506-10.

Turner M.W. (1996). Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunology Today*, **17 (11)**: 532-40.

Volanakis J.E. e Frank M.M. (1998). The human complement system in health and disease. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **57**: 581.

Wallis R. e Cheng J.Y. (1999). Molecular defects in variant forms of mannose-binding protein associated with immunodeficiency. *J. Immunol.*, **163 (9)**: 4953-59.

Wild J., Robinson D., Winchester B. (1983). Isolation of mannose-binding proteins from human and rat liver. *Biochem. J.*, **210 (1)**: 167-74.