

Raccolta dei liquidi ruminali per analisi presso IZSLER e UNICATT

1. Raccolta dei dati anamnestici aziendali mediante scheda allestita da UNICATT, analoga al modulo attualmente impiegato per i profili metabolici.
2. Prelievo di liquido ruminale (almeno 5 ml) da 10 capi bovini tramite ruminocentesi in un periodo compreso tra 4 e 7 ore dalla somministrazione della miscelata unifeed del mattino e trasferimento immediato in bagno di ghiaccio. Se il prelievo fosse effettuato tramite sonda esofagea (pure possibile), i valori di pH e acidi grassi volatili (AGV) potrebbero essere alterati. Qualora sia adottato un protocollo di alimentazione diverso dall'unifeed, saranno presi opportuni accordi operativi con l'azienda in questione. Lo stesso vale per il prelievo da specie di ruminanti diverse da *Bos taurus* (ovi-caprini, bufali).
3. Processazione dei campioni di rumine in giornata, previo trasporto refrigerato in bagno di ghiaccio da completarsi entro 3 ore dal prelievo.
4. In laboratorio (IZS, UNICATT, mangimificio) il campione di rumine viene frazionato nelle seguenti aliquote:
 - A) una provetta con **1 mL** di campione tal quale posto e conservato a -80°C per analisi citochina (IFN-gamma) e immunoglobuline (Ig, totali e IgM).
 - B) una provetta con **2-4 mL** di campione tal quale posto e conservato a -20°C per pH e acidi grassi volatili (AGV)
 - C) una provetta campione con **2 mL** aggiunto a una miscela siero fetale bovino (SFB) + DMSO nelle proporzioni /v/v): liquido ruminale 50%, SFB 40%, DMSO 10% per analisi su cellule infiltranti il liquido ruminale (PCR e citofluorimetro) da congelare a -80°C . Il volume finale (liquido ruminale + conservante) è compreso tra 2 (es. 1,0 mL rumine + 0,8 mL SFB + 0,2 mL DMSO) e 4 mL (2,0 mL rumine + 1,6 mL SFB + 0,4 mL DMSO).Le frazioni B congelate verranno inviate ad UNICATT, quelle A e C ad IZSLER-BS, tramite servizio corriere di IZSLER.
5. Qualora il volume di rumine prelevato ecceda il quantitativo di 5 ml, verrà preparata una seconda provetta come da punto 4.C) e le analisi PCR e citofluorimetriche potranno eventualmente essere eseguite su campioni singoli.

ANALISI

6. Per pH, AGV, citochina e Immunoglobuline (totali e IgM) si eseguono analisi sui campioni singoli.
7. Per analisi su cellule (provette C con SFB e DMSO), si allestiscono i campioni singoli (cellule mononucleate non batteriche), di cui si conserva 1/3 e si allestiscono poi 2 pool da 5 campioni l'uno (Il prodotto finale di ciascuno viene così ripartito:
 - a. I due pools sono estratti immediatamente con Trizol per il saggio PCR su 4 geni (GAPDH, CD45, Ig, KRT);
 - b. Il terzo restante di ciascun campione viene utilizzato o per l'esecuzione del saggio al citofluorimetro (Ag CD3, sIgM, A24) o per una eventuale ripetizione del saggio PCR in caso di esito dubbio (curva di melting anomala, reattività anomala del gene housekeeping).
8. Esito dei saggi in termini di:
 - a. "Dimostrata / non dimostrata presenza di infiltrati cellulari" per PCR e citofluorimetro;
 - b. Positivo / negativo / dubbio per citochina. Nanogrammi / ml di Ig totali e IgM;
 - c. pH del rumine, AGV totali (mmol/L) e composizione degli AGV in moli/100 moli totali.
9. Un'apposita sezione "Pareri e Interpretazioni" del rapporto di prova fornirà al cliente la visione d'insieme ed il commento dei risultati delle prove.