

Utilità dell'esame citologico del sedimento urinario per la valutazione della batteriuria



Introduzione e scopo del lavoro. Le infezioni delle vie urinarie sono comuni nel cane e nel gatto e l'urinocoltura rappresenta il "gold standard" per la diagnosi. L'esame citologico del sedimento urinario può tuttavia fornire informazioni diagnostiche preliminari molto utili al clinico. In questo studio si è voluto stimare l'accuratezza diagnostica della citologia nell'individuare la batteriuria e valutare l'agreement complessivo tra citologia e batteriologia nel diagnosticare infezioni causate da bastoncelli, cocchi e forme miste.

Materiali e metodi. Lo studio è stato condotto in maniera retrospettiva. Sono stati confrontati i risultati dell'esame citologico del sedimento urinario di campioni di urina di cani e gatti con l'esito dell'urinocoltura.

Risultati. Venivano inclusi nello studio 148 campioni di urina, di cui 109 di cane e 39 di gatto. 69 su 148 (47%) erano positivi alla coltura batteriologica (50 urine canine e 19 urine feline). La sensibilità della citologia nel rilevare la batteriuria risultava rispettivamente pari al 78,3% (casi totali), 82% (cani) e 68,4% (gatti); la specificità era pari a 93,7% (casi totali), 93,2% (cani) e 95% (gatti). L'accuratezza diagnostica complessiva risultava pari a 86,5% (casi totali), 88% (cani) e 82% (gatti). Il valore predittivo positivo risultava pari a 90,6% (casi totali), 90,0% (cani) e 92,2% (gatto). Il valore predittivo negativo era invece pari a 83,1% (casi totali), 85,9% (cane) e 76% (gatto).

Discussione. L'esame citologico del sedimento urinario è semplice da eseguire e i rilievi microscopici presentano una buona accuratezza diagnostica complessiva e una buona concordanza con l'urinocoltura.

Walter Bertazzolo^{1,2,*}
Med Vet,
EBVS® European
Specialist
in Veterinary Clinical
Pathology

Martine Didier³
Med Vet. PhD

Mattia Ridolfi²
Med Vet

Rachele Laurenti⁴
Med Vet

Ugo Bonfanti¹
Med Vet, EBVS®
European Specialist
in Veterinary
Clinical Pathology

INTRODUZIONE

Le infezioni del tratto urinario ("Urinary Tract Infections" - UTIs) del cane e del gatto, rappresentano un problema ordinario nella pratica clinica e l'esame colturale batteriologico è il metodo di elezione per la conferma diagnostica di batteriuria.¹⁻⁷ L'esame delle urine di base, mediante la valutazione del sedimento urinario, può tuttavia presentare rilievi microscopici che possono già

indirizzare verso una diagnosi di UTI: infatti la presenza di sedimento attivo, con ematuria, leucocituria e cristalluria da struvite sono spesso associati ad UTI. Inoltre l'esame, del sedimento urinario permette spesso di individuare la presenza di batteri. In precedenti studi è stato dimostrato come l'identificazione dei batteri nel sedimento urinario, inizialmente valutato su preparato fresco, possa migliorare mediante preparazione di strisci citologici a secco e con successiva colorazione con metodiche routinarie per ematologia/citologia, quali il Wright-Giemsa.⁷⁻¹⁰ In questi studi, l'accuratezza diagnostica nella ricerca dei batteri risultava superiore dopo preparazione citologica rispetto alla visualizzazione diretta a fresco.

¹ Laboratorio di analisi veterinarie LaVallonea, Via Sirtori, 9
20017 Passirana di Rho (Mi)

² Ospedale Veterinario Città di Pavia, Viale Cremona, 179
27100 Pavia

³ Clinica Veterinaria Gran Sasso, Via Donatello, 26 - 20131 Milano

⁴ Policlinico Veterinario Roma Sud, Via Pilade Mazza, 24
00173 Roma (RM)

*Corresponding Author (bertwalter@libero.it)

Ricevuto: 06/09/2018 - Accettato: 10/04/2019

Lo studio retrospettivo presentato in questa pubblicazione, ha preso spunto da un'indagine interna eseguita presso l'Ospedale Veterinario Città di Pavia per la valutazione del-

Le infezioni del tratto urinario (Urinary Tract Infections - UTIs) del cane e del gatto, rappresentano un problema ordinario nella pratica ambulatoriale e la coltura batteriologica quantitativa è il metodo di elezione per la conferma diagnostica di batteriuria.

l'agreement tra rilievi citologici del sedimento urinario e quelli colturali. In particolare si è voluto valutare:

- 1) La sensibilità, la specificità, i valori predittivi positivi e negativi dell'esame citologico rispetto all'esame colturale nei campioni della nostra casistica, e confrontare tali dati con quelli riportati in letteratura.⁷⁻¹⁰
- 2) Misurare l'accuratezza diagnostica della citologia nella corretta identificazione microscopica di batteri cocchiformi e bastoncellari, sempre avendo come gold standard i risultati dell'esame microbiologico.

MATERIALI E METODI

Questa ricerca retrospettiva è stata eseguita nel database dell'Ospedale Veterinario "Città di Pavia" al fine di individuare quei campioni di urine che erano stati sottoposti a successivo esame colturale, dopo un esame delle urine standard, comprendente valutazione macroscopica, esame chimico-fisico e del sedimento urinario. A tale scopo abbiamo revisionato i risultati archiviati degli esami urine effettuati nel periodo tra novembre 2011 e marzo 2015.

L'esame delle urine di base, mediante la valutazione del sedimento urinario, può già tuttavia presentare rilievi microscopici che possono indirizzare verso una diagnosi di UTI: la presenza di sedimento attivo, con ematuria, leucocituria e cristalluria da struvite sono spesso associati ad UTI.

L'esame del sedimento veniva eseguito di routine dopo centrifugazione per 5 minuti a 80 g. Il surnatante veniva separato ed utilizzato per l'esame chimico-fisico, mentre un'aliquota di sedimento pari al 10% del volume originario veniva dapprima risospesa ed analizzata a fresco al microscopio a 10x e 40x (ingrandimento dell'obiettivo), similmente a quanto riportato da Vap e Shropshire¹¹. In caso di sedimento attivo con presenza di >3 leucociti per campo ad obiettivo 40x e/o di batteri, veniva regolarmente eseguito un preparato citologico come di seguito spiegato: una piccola goccia di sedimento veniva strisciata delicatamente su un vetrino portaoggetto ed asciugata rapidamente con fonte di aria calda (asciugacapelli); successivamente veniva colorata con metodo del genere Romanowsky (May-Grünwald-Giemsa o Diff-Quik).

Al fine di poter essere inclusi nell'analisi statistica, i campioni dovevano presentare i seguenti criteri di inclusione:

- 1) I campioni dovevano essere stati prelevati per cistocentesi. I campio-

ni con sedimento attivo come sopra descritto, venivano sottoposti ad un esame microbiologico colturale. Nell'ospedale in cui è stato condotto lo studio, di routine i campioni di urina vengono raccolti dai clinici in mattinata, inizialmente posti in frigorifero, quindi riportati a temperatura ambiente per le analisi di routine. Un'aliquota, quando necessario, viene conservata e inviata entro le 15 del pomeriggio al laboratorio di microbiologia, dove i campioni vengono seminati. In questo modo, tra la raccolta e la semina non passano mai più di 8-10 ore, spesso anche molto meno. I campioni raccolti il pomeriggio/sera e durante la notte, vengono conservati in frigorifero, fino all'esecuzione dell'analisi, che viene condotta riportando le urine a temperatura ambiente. In tutto questo tempo i campioni erano mantenuti all'interno di un contenitore sterile ma non seminati su un terreno di trasporto.

- 2) La valutazione microscopica del sedimento, sia a fresco che citologica, veniva eseguita da un solo operatore (WB) che descriveva la presenza o assenza di batteri e li classificava in base alla morfologia in: cocchi, bastoncelli o misti. Questa valutazione era effettuata prima della ricezione dei risultati della coltura e quindi alla cieca rispetto ad essi.

I risultati della microbiologia rappresentavano il gold standard e, sulla base di questi, si valutavano sensibilità, specificità, accuratezza totale, valore predittivo positivo e negativo dell'esame citologico. Veniva inoltre valutato il grado di agreement tra le due metodiche mediante misurazione del coefficiente Kappa di Cohen.¹²

RISULTATI

Nello studio, venivano inclusi 148 campioni di urina, di cui: 109 di pazienti canini, 57 di sesso maschile e 49 di sesso femminile e 3 soggetti di sesso non precisato; 39 di pazienti felini, 20 di sesso maschile, 16 di sesso femminile e 3 di sesso non precisato.

Sul totale dei campioni analizzati, 69 (47%) erano positivi alla coltura batteriologica, di cui 50 urine canine e 19 urine feline. Nei pazienti con urinocoltura positiva, i batteri più frequentemente identificati nel cane erano: *E. coli* 27/50 (54%), *Staphylococcus* spp 9/50 (18%), *Streptococcus* spp 4/50 (8%), *Pseudomonas* spp 4/50 (8%) e *Proteus* spp 3/50 (6%). Nel gatto risultavano invece isolati *E. coli* 9/19 (47%), *Staphylococcus* spp 5/19 (26%) *Streptococcus* spp 3/19 (16%), *Proteus* spp 2/19 (11%).

I campioni analizzati mediante citologia, risultavano positivi per batteriuria in 59 casi su 148 (40%), di cui 45/109 (41%) nei campioni canini e 14/39 (36%) nei campioni felini. Mediante citologia, si identificavano batteri di aspetto bastoncellare in 42 pazienti totali (Figura 1), di cui 33 pazienti canini e 9 pazienti felini; batteri di aspetto cocchiforme in 11 pazienti totali (Figura 2), di cui 8 pazienti canini e 3 pazienti felini e forme miste in 6 pazienti totali (Figura 3), di cui 4 pazienti canini e 2 pazienti felini. La concordanza tra i risultati della citologia e della batteriologia è riassunta nella Tabella 1.

I coefficienti di agreement tra citologia e urinocoltura, risultavano pari a: 0,70 (casi totali), 0,71 (cane) e 0,65 (gatto). Nella Tabella 2 sono riportate le linee guida interpretative dei valori di agreement così calcolati.¹²

Tabella 1 - Riassunto del confronto tra esame citologico e batteriologico, in relazione alla concordanza tra i due metodi	
RISULTATI TOTALI	
Veri Negativi-Agreement Completo	74
Veri Positivi-Agreement Completo	48
Falsi Negativi-Disagreement	15
Falsi Positivi-Disagreement	5
Veri Positivi-Agreement Parziale	6
RISULTATI CANI	
Veri Negativi-Agreement Completo	55
Veri Positivi-Agreement Completo	36
Falsi Negativi-Disagreement	9
Falsi Positivi-Disagreement	4
Veri Positivi-Agreement Parziale	5
RISULTATI GATTI	
Veri Negativi-Agreement Completo	19
Veri Positivi-Agreement Completo	12
Falsi Negativi-Disagreement	6
Falsi Positivi-Disagreement	1
Veri Positivi-Agreement Parziale	1

Tabella 2 - Linee guida interpretative del coefficiente K di Cohen¹²	
Kappa	Concordanza
< 0.01	nulla
0.01-0.20	scarsa
0.21-0.40	modesta
0.41-0.60	moderata
0.61-0.80	buona
0.81-1.00	eccellente

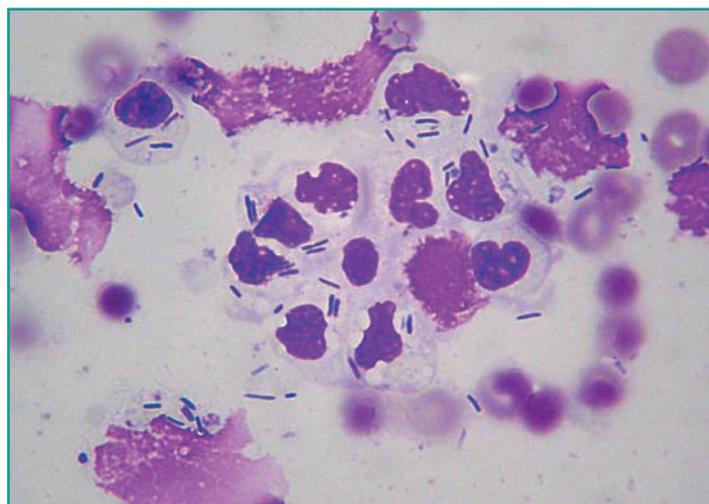


Figura 1 - Sedimento urinario di cane: presenza di rari eritrociti, numerosi granulociti neutrofili degenerati (cariolitici) e una popolazione singola di batteri di aspetto bastoncellare (May-Grünwald-Giemsa, 1000X).

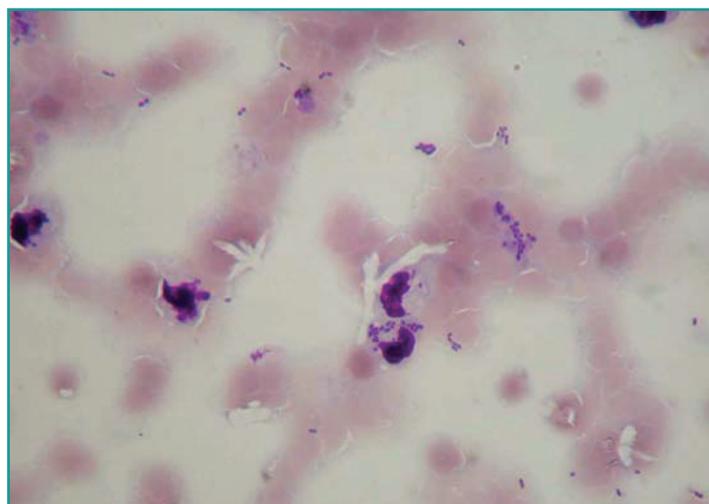


Figura 2 - Sedimento urinario di gatto: presenza di non rari eritrociti, occasionali granulociti neutrofili degenerati e una popolazione singola di batteri di aspetto cocchiforme (cocchi) (May-Grünwald-Giemsa, 1000X).

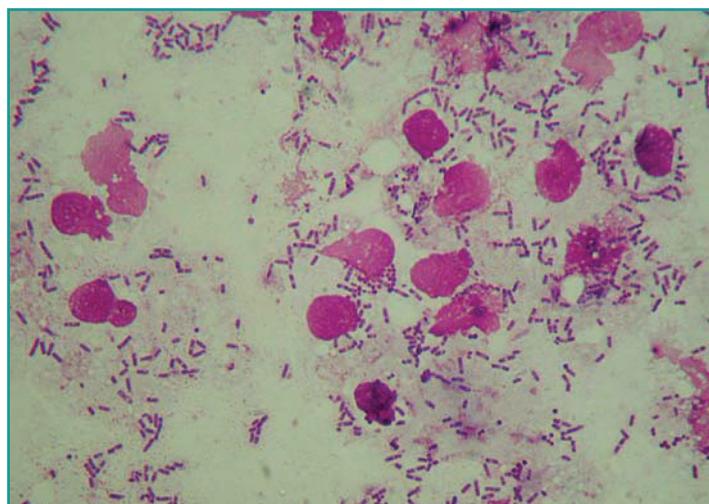


Figura 3 - Sedimento urinario di cane: presenza di numerosi granulociti neutrofili degenerati (cariolitici) e una popolazione mista di batteri (May-Grünwald-Giemsa, 1000X).

Tabella 3 - Riassunto dei valori di accuratezza diagnostica della citologia del sedimento urinario, suddivisi per casi totali, canini e felini

	Totali	Canini	Gatti
Sensibilità	78,3%	82%	68,4%
Specificità	93,7%	93,2%	95%
VPP	90,6%	90,0%	92,2%
VPN	83,1%	85,9%	76%
Accuratezza	86,5%	88%	82%

Accuratezza diagnostica

La sensibilità della citologia nel rilevare la batteriuria, risultava rispettivamente pari al 78,3% (casi totali), 82% (canini) e 68,4% (gatti), mentre la specificità era pari a 93,7% (casi totali), 93,2% (canini) e 95% (gatti).

L'accuratezza diagnostica complessiva risultava pari a 86,5% (casi totali), 88% (canini) e 82% (gatti).

Il valore predittivo positivo risultava pari a 90,6% (casi totali), 90,0% (canini) e 92,2% (gatto). Il valore predittivo negativo era invece pari a 83,1% (casi totali), 85,9% (cane) e 76% (gatto) (Tabella 3).

DISCUSSIONE

Nel cane e nel gatto le UTIs rappresentano un problema clinico molto frequente e l'esame delle urine standard può già fornire indicazioni cliniche e terapeutiche in attesa del successivo esame microbiologico.^{1-5,9} L'esecuzione dell'antibiogramma richiede alcuni giorni, pertanto vengono spesso impostate terapie antibatteriche empiriche non specifiche, oppure si evita di somministrare antibiotici fino alla ricezione del referto dell'esame colturale.

Una rapida identificazione dei batteri permette ai clinici di instaurare rapidamente trattamenti antibiotici molto prima che i risultati dell'urinocoltura siano disponibili.

La valutazione del sedimento a fresco (tal quale o previo trattamento con specifici coloranti per sedimento) è un metodo estremamente rapido ed economico che permette di identificare numerose alterazioni clinicamente rilevanti (es. presenza di cellule, cilindri, cristalli, batteri, ecc.).^{11,13} Tuttavia l'identificazione di batteri può risultare difficile e fuorviante a causa della presenza di particelle sospese in movimento (cosiddetti moti "Browniani") o di precipitati di colorante nel caso di preparati colorati. Per tali ragioni i falsi positivi possono essere estremamente frequenti^{8,9} conducendo a erronee iden-

tificazioni di microrganismi e quindi a trattamenti inutili o dannosi. In entrambi gli studi di Swenson et al.^{8,9}, il primo condotto su campioni canini mentre il secondo su campioni felini, la successiva preparazione di strisci citologici da sedimento conduceva a significative riduzioni delle percentuali di falsi positivi (nello specifico rispettivamente da 59,9% a 5,5% e da 40,7% a 1,3%), con conseguente incremento della specificità diagnostica nel primo caso da 76,4% a 99% mentre nel secondo da 56,7% a 98,7%. La stessa procedura favoriva anche l'identificazione dei veri positivi, con aumenti della sensibilità diagnostica rispettivamente da 82,4% a 93,2% e da 75,9% a 82,8%. Nel nostro studio abbiamo ottenuto valori pari a 78,3% di sensibilità e 93,7% di specificità sui casi totali, simili ma inferiori a quanto rilevato in entrambi gli studi sopra citati di Swenson et al.^{8,9} Confrontando

La corretta identificazione dei batteri nel sedimento urinario può essere migliorata mediante preparazione di strisci citologici a secco e successiva colorazione citologica.

i risultati dei campioni canini e di quelli felini da noi ottenuti, non vi erano differenze rilevanti di specificità (93,2% vs 95% rispettivamente per cani e gatti), mentre la sensibilità calcolata sui campioni felini (68,4%) risultava nettamente inferiore a quella dei campioni canini (82%). Questo risultato potrebbe in parte essere inficiato dalla diversa numerosità del campione (109 cani vs 39 gatti) in quanto non vi erano marcate differenze nelle proporzioni di infezioni da bacilli o cocchi tra le due specie. Va tuttavia sottolineato che il maggior numero di falsi negativi si rilevava nelle infezioni da cocchi, probabilmente a causa della maggior difficoltà nella loro identificazione al microscopio anche dopo colorazione citologica rispetto ai bastoncelli. Considerando infatti le sole infezioni pure, nel nostro studio su 66 casi di isolamenti singoli: 48 identificavano batteri bastoncellari mentre 18 identificavano cocchi. Di questi, 6/48 (12,5%) e 7/18 (38,9%) risultavano falsi negativi alla citologia. Queste diverse proporzioni sembrano quindi confermare come l'identificazione dei cocchi risulti più difficile in citologia rispetto ai bastoncelli. Anche la diversa carica batterica, non valutata nel nostro studio, potrebbe aver condotto a risultati non soddisfacenti in alcuni campioni.

Un cenno a parte va invece rivolto ai casi con isolamenti di batteri misti, che nella nostra casistica erano solamente 3 (2 cani e 1 gatto). In questa situazione la citologia è risultata altamente inefficiente dal punto di vista diagnostico in quanto è stata in grado di identificare solo un vero positivo (33,3% di sensibilità) commettendo 5 risultati falsi positivi. In 4 di questi casi la citologia ave-

va rilevato cocchi e bastoncelli ma i primi non erano stati isolati all'esame colturale. Quest'ultimo risultato va tuttavia ulteriormente approfondito: l'esame microbiologico è stato considerato da noi come il "gold standard" ma non possiamo escludere che in casi di infezioni miste, solo alcune specie batteriche riescano a proliferare "in vitro" mentre altre non riescano ad essere isolate in queste condizioni. Per tale ragione non possiamo escludere che in realtà i rilievi citologici fossero corretti.

I valori di agreement (concordanza) tra citologia e gold standard (urinocoltura) sono risultati buoni. Va sottolineato che il calcolo della concordanza è stato effettuato considerando in maniera molto restrittiva le concordanze tra tipi di batteri isolati. Per esempio: i casi in cui risultava una concordanza parziale venivano conteggiati come discordanza (es. popolazione mista in citologia vs solo bastoncelli all'urinocoltura).

Uno dei limiti dello studio è riconducibile alla metodica di conservazione dei campioni. Trattandosi di un lavoro retrospettivo, sebbene siano stati selezionati solo campioni prelevati per cistocentesi, non è stato invece possibile standardizzare una procedura costante di conservazione delle urine. Il tempo trascorso tra prelievo e semina, poteva variare quindi da 1-2 ore fino ad oltre 12 ore, nel caso di campioni raccolti durante la sera o la notte precedente. Inoltre, la durata della conservazione dei campioni a temperatura di refrigerazione prima e ambiente poi, non era standardizzata, proprio per la natura intrinseca dello studio. Questa variabile potrebbe aver influito sulla discrepanza dei risultati tra citologia ed esame colturale. I batteri a temperatura di refrigerazione possono mantenersi stabili ma anche andare incontro a morte. Vicversa, a temperatura ambiente possono proliferare eccessivamente batteri presenti in vivo ma anche crescere microrganismi contaminanti finiti accidentalmente nel campione. In base a dati disponibili in letteratura, la conservazione a temperatura ambiente non altera i risultati dell'esame microbiologico se questo viene condotto entro poche ore dal campionamento, mentre può fornire fino al 4% di risultati falsamente negativi e al 50% di falsi positivi se la semina viene effet-

tuata dopo 24 ore.¹⁴ La conservazione del campione a temperatura di refrigerazione può essere un'alternativa, ma uno studio recente ha dimostrato come la refrigerazione dei campioni di urina riduca la sensibilità dell'esame microbiologico, rispetto alla semina immediata, conducendo quindi a possibili falsi negativi.¹⁵ Come già sottolineato ciò potrebbe dipendere da una morte batterica o da una inibizione alla crescita in vitro. Un possibile rimedio o questa problematica è ricorrere a terreni di semina adatti al trasporto al laboratorio di microbiologia. In questo caso l'urina viene immediatamente seminata su appositi supporti, nei quali i batteri possono già iniziare a crescere.

L'esame citologico del sedimento urinario è una procedura di semplice esecuzione e basso costo, che associato alla valutazione routinaria del sedimento urinario a fresco, può fornire ulteriori valide informazioni cliniche.

In conclusione possiamo affermare che l'esame citologico del sedimento urinario è una procedura di semplice esecuzione e a basso costo che, associato alla valutazione routinaria del sedimento urinario a fresco, può fornire ulteriori valide informazioni cliniche. Nella nostra pratica quotidiana abbiamo introdotto tale procedura in tutte quelle occasioni in cui l'esame del sedimento mostra elementi cellulari e/o microrganismi, al fine di migliorare ed affinare il riconoscimento di eventuali batteri. Una rapida identificazione dei batteri permette ai clinici di instaurare rapidamente trattamenti antibiotici molto prima che i risultati dell'urinocoltura siano disponibili. Va sottolineato infatti che, nel presente studio, i microrganismi identificati come cocchi e bastoncelli risultavano sempre essere rispettivamente gram-positivi e gram-negativi all'esame colturale. Questo rilievo si traduce in un risvolto clinico importante, in quanto potrebbe essere già possibile impostare una terapia antibiotica più mirata per i due differenti gruppi di batteri, che hanno spesso sensibilità differenti all'antibiogramma.

PUNTI CHIAVE

- L'esame citologico del sedimento urinario ha mostrato una elevata accuratezza diagnostica per l'identificazione della batteriuria.
- La concordanza tra esame citologico del sedimento ed esame batteriologico è risultata buona.
- La maggior discordanza tra batteriologia e citologia del sedimento urinario si è riscontrata con le infezioni miste.

Utility of the cytological examination of urinary sediment for the evaluation of bacteriuria

Summary

Introduction and aim of the study. *Urinary Tract Infections (UTIs) are common in dogs and cats and urinary culture is considered the “gold standard” for the final diagnosis. However, the cytological examination of urinary sediment could give preliminary useful information. In this study, we retrospectively evaluated the accuracy of cytology for the identification of bacteriuria and the agreement between cytology and bacteriology in identifying infection caused by cocci, rods and mixed bacteria.*

Materials and methods. *This was a retrospective study. We compared the results of bacteriology with the cytology of the urinary sediment.*

Results. *A total of 148 urinary samples were included, 109 from dogs and 39 from cats. 69 of 148 (47%) were positive on microbiology (50 from dogs and 19 from cats). Sensitivity of cytology for bacteriuria was respectively 78,3% (total cases), 82% (dogs) and 68,4% (cats); specificity was 93,7% (total cases), 93,2% (dogs) and 95% (cats). Overall accuracy was 86,5% (total cases), 88% (dogs) e 82% (cats). The positive predictive value was 90,6% (total cases), 90,0% (dogs) and 92,2% (cats). The negative predictive value was 83,1% (total cases), 85,9% (dogs) and 76% (cats).*

Discussion. *Cytological examination of urinary sediment is simple to perform and showed a good overall accuracy in this study. The agreement with urinary culture was good.*

BIBLIOGRAFIA

1. Bartges JW. Diagnosis of urinary tract infections. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice* 34 (4): 923-933, 2004.
2. Weese JS, Blondeau JM, Boothe D, et al. Antimicrobial use guidelines for treatment of urinary tract disease in dogs and cats: antimicrobial guidelines working group of the international society for companion animal infectious diseases. *Veterinary Medicine International* 2011: 263768. doi: 10.4061/2011/263768. Epub 2011 Jun 27.
3. Smee N, Loyd K, Grauer G. UTIs in small animal patients: part 1: etiology and pathogenesis. *Journal of the American Animal Hospital Association* 49 (1): 1-7, 2013.
4. Smee N, Loyd K, Grauer G. UTIs in small animal patients: part 2: diagnosis, treatment and complications. *Journal of the American Animal Hospital Association* 49 (2): 83-94, 2013.
5. Sørensen TM, Jensen AB, Damborg P, et al. Evaluation of different sampling methods and criteria for diagnosing canine urinary tract infection by quantitative bacterial culture. *The Veterinary Journal* 216: 168-173, 2016.
6. Lulich JP, Osborne CA. Urine culture as a test for cure: why, when and how?. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* 34: 1027-1041, 2004.
7. Way LI, Sullivan LA, Johnson V, et al. Comparison of routine urinalysis and urine Gram stain for detection of bacteriuria in dogs. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 23 (1): 23-28, 2013.
8. Swenson CL, Boisvert AM, Kruger JM, et al. Evaluation of modified Wright-staining of urine sediment as a method for accurate detection of bacteriuria in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 224 (8): 1282-1289, 2004.
9. Swenson CL, Boisvert AM, Gibbons-Burgener SN, et al. Evaluation of modified Wright-staining of dried urine sediment as a method for accurate detection of bacteriuria in cats. *Veterinary Clinical Pathology* 40 (2) 256-264, 2011.
10. O'Neil E, Horney B, Burton S, et al. Comparison of wet-mount, Wright-Giemsa and Gram-stained of urine sediment for predicting bacteriuria in dogs and cats. *Canadian Veterinary Journal* 54: 1061-1066, 2013.
11. Vap LM, Shropshire SB. Urine cytology. Collection, Film Preparation, and Evaluation. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* 47: 135-149, 2017.
12. Altman DG. Some common problems in medical research. In: *Practical statistics for medical research*. London: Chapman & Hall, 1999, pp. 396-439.
13. Sink CA, Weinstein NM. Routine urinalysis: microscopic elements. In: *Practical Veterinary Urinalysis*. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2012, pp. 55-112.
14. Padilla J, Osborne CA, Ward GE. Effect of storage and temperature on quantitative culture of canine urine. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 178 (10): 1077-1081, 1981.
15. Acierno MJ, Partyka M, Waite K, da Cunha A, Mitchell MA. Effect of refrigeration of clinical canine urine samples on quantitative bacterial culture. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 253 (2): 177-180, 2018.