



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**

Institutionerna för biomedicin och veterinär
folkhälsovetenskap samt kliniska vetenskaper

Hantering och förvaring av urinprov från hund efter provtagning; effekt på den bakteriella växten

Lovisa Hällström

*Uppsala
2018*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2018:15*

Hantering och förvaring av urinprov från hund efter provtagning; effekt på den bakteriella växten

Handling of canine urine samples after collection; effects on bacterial growth

Lovisa Hällström

Handledare: Lena Pelander, Institutionen för kliniska vetenskaper, SLU

Biträdande handledare: Ingrid Hansson, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

Biträdande handledare: Ulrika Windahl, Statens veterinärmedicinska anstalt

Examinator: Susanna Sternberg, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0830

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2018

Delnummer i serie: Examensarbete 2018:15

ISSN: 1652-8697

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: *Urinvägsinfektion, bakteriell växt, hund, hantering, förvaring*

Key words: *Urinary tract infection, bacterial growth, canine, handling, storage*

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionerna för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap sam kliniska vetenskaper

SAMMANFATTNING

Infektioner i urinvägarna är vanligt förekommande hos hund. Diagnos och behandling baseras i stor utsträckning på resultat från analys av urinprov, vilket inkluderar bakteriologisk odling och identifiering av bakteriuri. Både nationella och internationella rekommendationer finns kring vilken provtagningsmetod som anses bäst och hur urinprovet ska hanteras efter provtagning för mest tillförlitligt resultat. Trots flertalet rekommendationer finns endast ett fåtal publicerade studier som har undersökt eventuellt samband mellan växt av bakterier och hantering av urinprovet.

Syftet med denna studie var att undersöka hur hantering av urinprov under tiden närmast efter provtagningstillfället påverkar den bakteriella växten avseende vilka bakterier som förekommer samt mängden av bakterier. Syftet var även att undersöka om växt på Uricult® Trio ändrades vid förvaring i rumstemperatur efter odling. För att undersöka detta simulerades olika sätt ett urinprov kan hanteras under kliniska förhållanden innan det analyseras. I studien analyserades urinprov enligt standardmetod på odling på blod- och CLED-agar eller på Uricult® Trio.

Totalt insamlades 37 urinprover, 13 prover insamlades via cystocentes, två prover via kateter och 22 prover var spontankastade. Flera intressanta observationer gjordes i studien. Risken för skillnad i förekomsten av potentiellt patogena bakterier ett urinprov som förvaras i sterilt provrör innan odling anses låg men mängden bakterier med avseende på CFU/ml förändras i stor utsträckning. De urinprov som förvarades i kylskåp förändrades i minst utsträckning och ansågs ge mest tillförlitliga resultat. Resultaten av studien indikerar att Uricult® Trio är ett bra och tillförlitligt medium för att identifiera bakteriuri men inte lika bra på att identifiera arter när det finns två eller fler bakteriearter i samma prov. Uricult® Trio anses dock som ett bra alternativ när odling på blod- och CLED-agar inte är möjlig. Materialet i denna studie var dock litet och liknande studier med större material är nödvändigt för att kunna dra några säkra slutsatser.

SUMMARY

Infection in the urinary tract is common in dogs. Diagnosis and treatment are based on clinical signs, and on results from urine analysis, which includes bacterial culture and identification of bacteriuria. Several national and international guidelines are available that recommend how the urine sample should be collected and handled to assure reliable results. However, there are few published studies that have investigated possible associations between bacterial growth (quantity and species) and handling of urine samples.

The aim of this study was to investigate in what way handling of urine samples, immediately after collection, affects bacterial growth regarding bacterial species and quantity. The aim of the present study was also to investigate whether or not results of urine culture using Uricult® Trio changed, if stored at room temperature after cultivation. To investigate this, urine samples were handled in different ways to simulate differing clinical scenarios. In this study, urine samples were analysed, according to standard quantitative cultures, on blood- and CLED-agar or on Uricult® Trio.

A total of 37 urine samples were collected in this study; 13 samples were collected by cystocentesis, two samples by catheter and 22 samples by midstream voiding. Several interesting observations were made. Growth of a different potentially pathogenic bacterial species (compared to initial culture results) in a urine sample that is stored before cultivation is small, but the quantity of bacteria (CFU/ml) changes to a greater extent. Urine samples stored in refrigerators were only minimally different and were considered to give the most reliable results. Results of the present study indicate that Uricult® Trio is a good and reliable medium for identifying bacteriuria but slightly less reliable for identification of mixed growth with several bacterial species. However, the sample size in this study was too small to make significant conclusions, and similar studies with larger sample sizes are necessary.

INNEHÅLL

Inledning.....	1
Litteraturoversikt.....	2
Urinvägsinfektion.....	2
Klassificering av urinvägsinfektioner	2
Subklinisk bakteriuri	2
Signifikant bakteriuri.....	3
Kliniska sjukdomstecken.....	3
Etiologi.....	3
Bakterier som kan orsaka urinvägsinfektion	4
Provtagningsmetod.....	4
Diagnostik	5
Urinalys	5
Sedimentundersökning	5
Bakteriologisk analys	5
Doppglas.....	6
Behandling	6
Påverkan på bakterier i urinen vid hantering av urinprov	6
Material och metoder.....	8
Insamling av material	8
Hantering och odling av urinprov	8
Utförande av steg A, D, E och F	10
Utförande av steg B.....	10
Utförande av steg C.....	10
Identifiering av bakterier	10
Identifiering av antal arter	10
Beräkning av antalet bakterier.....	10
Resultat.....	11
Insamlat material	11
Initial odling på blod- och CLED-agar (A).....	11
Identifierade bakteriearter vid initial odling.....	12
Skillnad i bakteriell växt mellan initial odling på blod- och CLED-agar (A) och odling efter förvaring i rumstemperatur och/eller kylskåp (D, E och F)	13
Skillnad i mängd bakterier efter förvaring	13
Avläsning och tolkning av bakteriell växt på blod- och CLED-agar	15
Skillnad i förekomst av potentiellt patogena bakteriearter	16
Ytterligare påvisade bakteriearter i urinprov efter förvaring.....	16
Skillnad i bakteriell växt mellan de initiala odlingsätterna (A och B)	16
Skillnad i förekomst av potentiellt patogena arter.....	17
Avläsning och tolkning av Uricult® Trio	17
Diskussion	18
Referenser.....	21
Bilaga 1	1

LISTA ÖVER FÖRKORTNINGAR

CFU/ml = colony forming units/milliliter

CLED = Cystein Lactose Electrolyte Deficite

ISCAID = The International Society for Companion Animal Infectious Diseases

LV = Läkemedelsverket

Maldi-Tof MS = Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry

RO = Renodling

SVF = Sveriges veterinärförbund

UVI = Urinvägsinfektion

INLEDNING

Urinvägsinfektion (UVI) är en vanligt förekommande bakteriell infektion hos hund (Wooley & Blue, 1976; Ball *et al.*, 2008; Weese *et al.*, 2011) och en vanlig orsak till antibiotikaanvändning (Weese *et al.*, 2011; Jessen *et al.*, 2015). Diagnos och behandling baseras i stor utsträckning på resultat från urinprov vilket inkluderar bakteriologisk odling samt urinanalys med sedimentundersökning (Läkemedelsverket (LV), 2016; Weese *et al.*, 2011). I Sveriges veterinärförbunds (SVF) nationella antibiotikapolicy för hund- och kattsjukvård (2009) rekommenderas att urinprov tas via cystocentes och att bakteriologisk odling påbörjas inom 20 minuter efter provtagning för att undvika felaktiga resultat. The International Society for Companion Animal Infectious Diseases (ISCAIDS) rekommenderar provtagning via cystocentes och att bakteriologisk odling påbörjas snarast efter provtagningen. Om provet inte kan analyseras direkt bör det förvaras i kylskåp men inte under längre tid än högst ett dygn (Weese *et al.*, 2011). Dessa rekommendationer finns för att minska risken för felaktiga resultat av bakteriologiska odlingar som i sin tur kan leda till ökad antibiotikaanvändning, dock finns för få publicerade studier som har undersökt hur den bakteriologiska växten förändras vid förvaring för att avgöra hur det påverkar resultatet vid odling.

Syftet med denna studie var att undersöka hur hanteringen av urinprov under tiden närmast efter provtagningstillfället påverkar den bakteriella växten avseende vilka bakteriearter som påvisas, samt mängden av bakterier. Syftet var även att undersöka om bakteriell växt på Uricult® Trio påverkas vid förvaring i rumstemperatur efter odling.

LITTERATURÖVERSIKT

Urinvägsinfektion

Infektioner i urinvägarna är vanligt förekommande infektioner hos hund och en vanlig orsak till veterinärbesök och antibiotikaanvändning (Weese *et al.*, 2011; Smee *et al.*, 2013a; Jessen *et al.*, 2015). I en studie från Amerika uppskattades det att ca 14 % av alla hundar drabbas av UVI någon gång under sin livstid (Ling, 1984). Flertalet studier tyder på att tikar drabbas oftare än hanhundar (Ling, 1984; Bartges, 2004; Smee *et al.*, 2013a).

Bakterier i urinen kallas bakteriuri men bakteriuri är inte synonymt med UVI. För att en UVI ska klassas som kliniskt relevant ska kliniska sjukdomstecken ses samtidigt som bakterier påvisas i urinen (Weese *et al.*, 2011). Anledningen är att bakterier kan förekomma i urinblåsan utan att en klinisk infektion föreligger, så kallad subklinisk bakteriuri (Bartges, 2004; Weese *et al.*, 2011; Smee *et al.*, 2013b). Bakterier kan även förekomma vid kontaminering av urinprovet under och/eller efter provtagningen (Smee *et al.*, 2013b).

Klassificering av urinvägsinfektioner

Kliniskt relevanta urinvägsinfektioner kan klassificeras som sporadiska eller återkommande bakteriella urinvägsinfektioner (Sykes, 2017). Två andra klassifikationer är enkla respektive komplicerade urinvägsinfektioner (Lulich & Osborne, 2004; Weese *et al.*, 2011; Smee *et al.*, 2013a). För återkommande infektioner finns ett starkt samband med predisponerande faktorer, t.ex. urinsten hos den drabbade individen (Seguin *et al.*, 2003; Lulich & Osborne, 2004; Weese *et al.*, 2011). Det förekommer även fall utan att predisponerande faktorer identifieras (Weese *et al.*, 2011). Återkommande urinvägsinfektioner kan klassificeras som reinfektion eller relaps. Persisterande infektioner och superinfektioner kan också förekomma (Weese *et al.*, 2011; Seguin *et al.*, 2013). Reinfektion kan misstänkas när hunden utvecklar en klinisk UVI inom tolv månader med en annan bakterieart än vid det tidigare infektionstillfället (Seguin *et al.*, 2003; Lulich & Osborne, 2004; Weese *et al.*, 2011). En kliniskt relevant UVI som återkommer inom tolv månader med samma bakterieart kan misstänkas vara en relapsande urinvägsinfektion. Relaps uppstår ofta tidigare än reinfektion (Weese *et al.*, 2011; Seguin *et al.*, 2013). I praktiken är det dock inte möjligt att skilja mellan relaps och reinfektion eftersom bakteriearter inte identifieras på mer än fenotypisk nivå (Weese *et al.*, 2011). Vid persisterande infektioner kvarstår bakteriuri både under och efter behandling (Weese *et al.*, 2011; Seguin *et al.*, 2013). Vid superinfektion diagnostiseras en infektion med ny bakterieart samtidigt som behandling pågår av en pågående infektion med en annan bakterieart (Seguin *et al.*, 2003; Smee *et al.*, 2013b).

Urinvägsinfektioner kan också klassificeras efter vilken anatomisk lokalisation infektionen har. Den kan vara belägen till en specifik del av urinvägarna eller till två eller flera delar. Infektion belägen i njurar och uretärer kallas övre UVI medan infektion i urinblåsa och urethra kallas nedre UVI. En övre och nedre urinvägsinfektion kan förekomma samtidigt (Bartges, 2004; LV, 2016).

Subklinisk bakteriuri

Förekomst av bakterier i urinen utan att hunden uppvisar kliniska sjukdomstecken kallas subklinisk bakteriuri (Bartges, 2004; Weese *et al.*, 2011; Smee *et al.*, 2013b; Sykes, 2017). Halten av bakterier samt dess resistensmönster är inte avgörande för klassificeringen (McGhie *et al.*, 2014; Weese *et al.*, 2011). Prevalensen av subklinisk bakteriuri har uppskattats till 2,1 – 8,9 % hos friska hundar (McGhie *et al.*, 2014; Wan *et al.*, 2014). En subklinisk bakteriuri behöver inte alltid behandlas men behandling ska övervägas om det finns risk för ascenderande eller systemisk infektion (Weese *et al.*, 2011; Sykes, 2017). Prevalensen av subklinisk bakteriuri anses vara högre hos hundar med nedsatt immunförsvar eller glukosuri t.ex. vid hyperadrenkortisism eller diabetes mellitus (McGhie *et al.*, 2014). I en studie som undersökte förekomst av bakteriuri hos hundar på långtidsbehandling med glukokortikoider förekom subklinisk bakteriuri i 18,1 % av fallen (Torres *et al.*, 2005). I en annan studie identifierades sjukdom såsom neoplasi, neurologisk sjukdom, njursjukdom eller immunmedierade sjukdom i 80,5 % av fallen med subklinisk bakteriuri (Tivipasi *et al.*, 2009).

Signifikant bakteriuri

Begreppet signifikant bakteriuri har tidigare använts dels för att beskriva att mängden bakterier i ett urinprov är tillräckligt hög för att troligen orsaka UVI och dels som ett hjälpmedel för att försöka skilja mellan växt av kontaminanter respektive patogener (Carter *et al.*, 1978; Bartges, 2004). Tidigare ansågs det som signifikant bakteriuri om >100 000 CFU/ml detekterades. Om den bakteriella växten var <10 000 CFU/ml ansågs det som kontaminering och därmed inte signifikant bakteriuri oavsett provtagningsteknik (Wooley & Blue, 1976; Carter *et al.*, 1978; Padilla *et al.*, 1981; Comer och Ling, 1981). En modifierad klassificering tillkom beroende på vilken provtagningsmetod som använts, lägre halter klassades som signifikanta om provet var taget via cystocentes eller via kateter. För prov via cystocentes ansågs signifikant bakteriuri föreligga om >1 000 CFU/ml och för prov via kateter >10 000 CFU/ml (Bartges, 2004; Tivipasi *et al.*, 2009; Weese *et al.*, 2011; Smee *et al.*, 2013b; McGhie *et al.*, 2014;). Ett flertal forskare har även rekommenderat att all bakteriell växt från ett korrekt insamlat och förvarat urinprov via cystocentes ska betraktas som signifikant växt eftersom provtagningstekniken inte bör medföra kontaminering (Ling *et al.*, 2001; Bartges, 2004; Lulich & Osborne, 2004; Weese *et al.*, 2011).

På senare tid ska kliniska sjukdomstecken och bakteriuri förekomma samtidigt för att det ska klassificeras som en UVI, eftersom subklinisk bakteriuri förekommer (Weese *et al.*, 2011). Bland annat påvisade McGhie *et al.* (2014) att växt av bakterier i höga halter (>100 000 CFU/ml) förekom i urinprover insamlade via cystocentes från kliniskt friska hundar. Detta medför att terminologin inte längre kan användas men begreppet signifikant bakteriuri används dock fortsatt som ett hjälpmedel för att försöka skilja relevant bakteriell växt från kontaminanter i spontankastade prover (Smee *et al.*, 2013b; LV, 2016). Resultat av odlingar av spontankastade prover bör dock alltid tolkas med försiktighet. I ett flertal publikationer avråder författarna från odling av spontankastade prover då de ansett att kontaminanter kan förekomma i >100 000 CFU/ml och därmed att begreppet signifikant bakteriuri inte alltid enbart representerar patogener (Bartges, 2004; Weese *et al.*, 2011).

Kliniska sjukdomstecken

De kliniska sjukdomstecken som ses vid UVI är inte patognomona för infektionen (Weese *et al.*, 2011). Icke-infektiösa processer såsom till exempel urinstenar, trauma och neoplasi kan orsaka inflammation i urinvägarna och ge upphov till liknande sjukdomstecken som ses vid en bakteriell infektion (Thomsen *et al.*, 1986; Lulich & Osborne, 2004).

Typiska sjukdomstecken som förekommer vid UVI inkluderar pollakiuri, stranguri och dysuri (Bartges, 2004; Lulich & Osborne, 2004; Weese *et al.*, 2011). Urinen kan även lukta illa (Bartges, 2004). Vid övre UVI kan också sjukdomstecken, såsom feber, nedsatt allmäntillstånd och endotoxinemi, ses till följd av systemisk spridning av infektion samt nedsatt njurfunktion. Kliniska sjukdomstecken kan också ses till följd av andra samtidiga sjukdomar (Bartges, 2004).

Etiologi

Urinvägsinfektion uppstår när mikroorganismer adhererar, koloniserar och multiplicerar sig på uroepitelet. Det kan ske vid en temporär eller permanent försämring av individens försvarsmekanismer vilket gör att mikroorganismerna lyckas invadera urinvägarna (Bartges, 2004; Lulich & Osborne, 2004; Smee *et al.*, 2013a). De vanligaste mikroorganismer som orsakar UVI är bakterier (Bartges, 2004; Lulich & Osborne, 2004; Weese *et al.*, 2011) men även jäst, svamp, virus och parasiter kan orsaka UVI (Norris *et al.*, 2000; Bartges, 2004; Ball *et al.*, 2008; Smee *et al.*, 2013a). Hos hund är det vanligast att tarmbakterier eller bakterier från yttre genitalia orsakar UVI. Bakterierna ascenderar då via urethra till urinblåsan (Thomsen *et al.*, 1986; Bartges, 2004; Smee *et al.*, 2013a).

Predisponerande faktorer för utvecklandet av UVI inkluderar diabetes mellitus, hyperadrenokortisism, njursvikt, urinstenar samt anatomiska, funktionella och neurologiska urinvägsdefekter (Weese *et al.*, 2011; Seguin *et al.*, 2013). I en studie identifierades predisponerande faktorer i ca 70 % av hundar med återkommande urinvägsinfektioner (Seguin *et al.*, 2003). Struvitstenar är den typ av urinsten som

vanligast ses hos hundar med klinisk UVI. Infektion med ureas-producerande bakterier, såsom koagulaspositiva *Staphylococcus* spp. är predisponerande för struvitbildning (Ling, 1984; Smee *et al.*, 2013b). Även infektion med bakterier såsom *Proteus* spp., *Corynebacterium* spp., *Klebsiella* spp. och *Ureaplasma* spp. anses kunna öka risken för bildandet av urinstenar. Enligt Smee *et al.* (2013b) anses >90 % av struvitstenar hos hund uppstå sekundärt till UVI.

Bakterier som kan orsaka urinvägsinfektion

Escherichia coli (*E. coli*) är den bakterie som oftast isoleras från fall med misstänkt UVI hos hund. Andra vanliga bakterier är *Proteus* spp., *Staphylococcus* spp. (*S. pseudintermedius*, *S. aureus*), *Enterococcus* spp., *Klebsiella* spp., Betahemolyserande *Streptococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* och *Mykoplasma* spp. (Wooley & Blue, 1976; Ling, 1984; Norris *et al.*, 2000; Ling *et al.*, 2001; Cohn *et al.*, 2003; Seguin *et al.*, 2003; Ball *et al.*, 2008; Tivipasi *et al.*, 2009; Rowlands *et al.*, 2011; Windahl *et al.*, 2014). I Windahls avhandling kunde sju specifika uropatogener identifieras (Windahl, 2015) och i flertalet studier har det konstaterats att ett fåtal bakteriearter står för >95 % av infektionerna (Ling *et al.*, 2001; Cohn *et al.*, 2003; Bartges, 2004; Windahl *et al.*, 2014; Sørensen *et al.*, 2016). Även vid subklinisk bakteriuri är *E. coli* den bakterie som oftast identifieras (Smee *et al.*, 2013b; McGhie *et al.*, 2014) och i en studie förekom riklig växt (>100 000 CFU/ml) i 66 % av fallen med bakteriuri men där hundarna inte visade kliniska symptom på UVI (McGhie *et al.*, 2014).

I de flesta fall anses att endast en bakterie orsakar urinvägsinfektionen men i flertalet studier har två eller fler bakterier identifieras som troliga patogener i 8 - 40 % av fallen (Wooley & Blue, 1976; Ling, 1984; Ling *et al.*, 2001; Rowlands *et al.*, 2011). I en studie förekom fler än en bakterie oftare hos tikar än hanar (36,9 % vs 28,8 %) (Ling *et al.*, 2001).

Provtagningsmetod

Vid insamling av urin bör kontaminering undvikas eftersom det kan försvåra bedömningen av hur relevant resultatet av bakterieodlingen är. De vanligaste sätten att samla urinprov är via cystocentes, via kateter eller spontankastat urinprov (Ling, 1984; Bartges, 2004; Weese *et al.*, 2011). Den bästa metoden för att samla ett representativt urinprov anses vara cystocentes (Weese *et al.*, 2011; Bartges, 2004). Insamlingsmetoden anses vara enkel, säker och risken för kontamination minimal. Cystocentes bör därför om möjligt utföras rutinmässigt såvida ingreppet inte är medicinskt kontraindicerat för hunden (Comer & Ling, 1981; Ling, 1984; Bartges, 2004; Weese *et al.*, 2011).

Undersökning och odling av ett urinprov insamlat via kateter eller ett spontankastat prov är mindre önskvärt på grund av den ökade risken för kontaminering med dessa provtagningsmetoder. Kontamineringen kan ske när urinen eller katetern passerar de distala urinvägarna som normalt innehåller en blandflora med bakterier (Carter *et al.*, 1978; Comer och Ling, 1981; Bartges, 2004; Weese *et al.*, 2011). En annan risk vid provtagning via kateter är att bakterier förs med från distala genitalkanalen till urinblåsan och orsakar en så kallad iatrogen UVI (Lulich & Osborne, 2004). Båda provtagningsätten kan användas om omständigheterna inte tillåter cystocentes (Windahl *et al.*, 2014) men urinprov via kateter anses mer tillförlitliga än spontankastade (Weese *et al.*, 2011). Sørensen *et al.* (2016) ansåg att spontankastade prover kan vara representativa om de analyseras kort efter insamling och om cut-off värdet >100 000 CFU/ml användes.

Flertalet studier har jämfört förekomsten av bakterier mellan olika provtagningsmetoder i försök att utreda vilka metoder som ger mest representativa urinprover. I en studie jämfördes bakteriehalten i prover insamlade via cystocentes, kateter och spontankastade från friska hundar. Signifikant bakteriuri, definierad som >100 000 CFU/ml, noterades inte i något av proverna oavsett provtagningsätt men spontankastade prover ansågs vara i störst riskzon att bli associerad med falskt positiva resultat (>10 000 CFU/ml) då 16 % av proverna visade bakteriell växt mellan 10 000 - 100 000 CFU/ml (Carter *et al.*, 1978). I en annan studie jämfördes spontankastat och kateterprov med varandra. I den studien innehöll spontankastade prover högre halter bakterier än de tagna via kateter men bakteriell växt >100 000 CFU/ml förekom inte i något prov (Thomsen *et al.*, 1986). I ytterligare en studie där bakteriell växt

jämfördes mellan prover insamlade via cystocentes och spontankastade prover från samma hundar visade de flesta prov med bakteriuri på bakteriell växt >100 000 CFU/ml oavsett insamlingsmetod (Sørensen *et al.*, 2016). Även Comer och Ling (1981) jämförde i en studie den bakteriella växten i urinprov tagna via cystocentes och prov tagna via kateter eller spontankastat prov. Varje hund bidrog med ett urinprov insamlat via cystocentes samt ett urinprov insamlat via kateter eller ett spontankastat prov. I studien var alla urinprov insamlade via cystocentes sterila men i 10 % av kateterproverna och 35 % av de spontankastade proverna påvisades riklig växt (>100 000 CFU/ml). Antalet bakterier kunde beräknas i 26 % (8 av 30) av proverna tagna via kateter och 85 % (17 av 20) av spontankastade proverna. I den beräkningen inkluderades även prov som innehöll <100 000 CFU/ml. Att identifiera antal CFU/ml är en viktig del för att kunna göra en korrekt bedömning av resultatet från prover tagna via dessa insamlingsmetoder (Comer & Ling, 1981).

Diagnostik

Sjukdomstecken som ses vid UVI är som ovan nämnts inte patognomona för infektion. För att ställa diagnos behöver ytterligare undersökningar utföras vilket inkluderar bakteriologisk urinodling samt fullständig urinanalys med sedimentundersökning (Bartges, 2004; Lulich & Osborne, 2004; Weese *et al.*, 2011). Diagnos ställs efter sammanvägande av kliniska fynd, anamnes, fullständig urinanalys och bakteriologisk odling (Weese *et al.*, 2011; Smee *et al.*, 2013b).

Blodprovparametrar, såsom hematologi och biokemiska analyser, är vanligtvis normala om inte annan samtidig sjukdom föreligger. Om infektionen spridit sig systemiskt kan t.ex. leukocytos med vänsterförskjutning förekomma (Bartges, 2004).

Urinanalys

En fullständig urinanalys omfattar identifiering av urinspecifik densitet med hjälp av en refraktometer samt urinstix för kemiska analyser (Bartges, 2004; Weese *et al.*, 2011). Utspädd urin ses ofta hos patienter med sjukdomar såsom hyperadrenokortisism, kronisk njursjukdom och diabetes mellitus samt vid infektion i övre urinvägar (Smee *et al.*, 2013b). Urindensiteten varierar även beroende på tid på dygnet, vätskeintag och tid sedan urinering. Vid UVI påvisas ofta, men inte alltid, hematuri och proteinuri. Urinens pH kan vara förhöjt (Thomsen *et al.*, 1986; Lulich & Osborne, 2004; Bartges, 2004; Weese *et al.*, 2011; Smee *et al.*, 2013b). Leukocyt- och nitrit-fälten på urinstix anses inte tillförlitliga för hund och bör inte användas (Bartges, 2004; Smee *et al.*, 2013b).

Sedimentundersökning

Undersökning av urinsediment med hjälp av mikroskopi bör alltid utföras för att identifiera bakterier och vita blodkroppar (Bartges, 2004; Smee *et al.*, 2013b). Vid förhöjt antal vita blodkroppar i urinen, pyuri, ses vanligtvis >3 - 5 vita blodkroppar per synfält vid mikroskopering med 100 gångers förstoring av urinprov insamlat via cystocentes. Om provet är spontankastat eller insamlat med hjälp av urinkateter ökar sannolikheten att bakterier och vita blodkroppar från yttre genitalia och hud är med i provet. I sådana prov ses vanligtvis >5 - 10 vita blodkroppar per synfält (Bartges, 2004; Tivipasi *et al.*, 2009). Påvisande av bakteriuri tillsammans med pyuri kan vara en indikation på att infektion kan föreligga (Bartges, 2004; Lulich & Osborne, 2004). Resultatet av sedimentundersökning och bakteriell växt vid odling har dock i flera studier visats stämma dåligt överens. Att enbart använda sedimentundersökning för att utesluta eller bekräfta förekomst av bakterier i urinen rekommenderas därför inte (Tivipasi *et al.*, 2009; McGhie *et al.*, 2014).

Bakteriologisk analys

Bakteriologisk undersökning av urin är viktigt för att identifiera bakteriuri och bör alltid ske vid misstänkt UVI (Padilla *et al.*, 1981; Lulich & Osborne, 2004; Smee *et al.*, 2013b). Odling av jäst och svamp utförs om dessa identifieras vid sedimentundersökning (Bartges, 2004).

Bakteriologisk odling kan vara kvalitativ eller kvantitativ. Kvalitativa urinodlingar inkluderar enbart isolering och identifiering av bakterier. Kvantitativa urinodlingar inkluderar utöver isolering och

identifiering av bakterier även beräkning av antalet "colony forming units" (CFU). Antalet CFU redovisas vanligtvis per milliliter urin (CFU/ml). Kvantitativa odlingar är ett hjälpmedel för att bedöma om bakteriell växt kan antas vara kontaminering eller patogen. Kvantitativ odling kan vara att föredra särskilt när urinprovet är spontankastat eller taget med hjälp av kateter (Carter *et al.*, 1978; Bartges 2004; Lulich & Osborne, 2004; Weese *et al.*, 2011). Padilla *et al.* (1981) visade dock att bakteriehalterna i urinprov förändras vid förvaring och ansåg därför att kvantitativa odlingar främst är av hjälp om odling sker direkt efter provtagning. Bakteriologiska odlingar har även tidigare rekommenderats under pågående behandling och efter avslutad behandling för att utvärdera effekten (Lulich & Osborne, 2004; Weese *et al.*, 2011) men om hunden saknar kliniska sjukdomstecken under behandling saknas oftast indikation för dessa typer av analyser (Sykes, 2017).

Doppglas

Odlingsmedier i form av doppglas kan användas för att detektera bakteriuri, ett exempel på doppglas som används på smådjurskliniker är Uricult® Trio. Vid identifiering av bakteriuri kan doppglasen vid behov skickas vidare till ett ackrediterat laboratorium för identifiering av bakterieart och resistensmönster (Weese *et al.*, 2011b; Ybarra *et al.*, 2014). Vid bakterienivåer >100 000 CFU/ml har identifiering av bakteriuri med hjälp av doppglas på klinik visats stämma väl överens med identifiering av bakteriuri med hjälp av odling vid laboratorium. I en amerikansk studie överensstämde bakteriearter från doppglas med standardodling på laboratorium i 75 % av fallen (Ybarra *et al.*, 2014). Med avseende på det rekommenderade Ybarra *et al.* (2014) att ett separat sterilt provrör med urin bör skickas till laboratorium för identifiering av bakterieart.

Behandling

Behandling mot UVI inkluderar i de flesta fall antibiotikaanvändning vilket medför en risk för utveckling av antibiotikaresistens. Val av antibiotika bör ske baserat på resistensmönster hos aktuell bakterie. Bakteriologisk undersökning och resistensbestämning bör alltid ske innan antibiotikabehandling påbörjas (Bartges, 2004; Weese *et al.*, 2011). Enligt LV:s behandlingsrekommendationer "Dosering av antibiotika till hund" rekommenderas amoxicillin som förstahandspreparat till okomplicerade bakteriella cystiter med en behandlingslängd som fortgår till två dagar efter kliniska sjukdomstecken upphört alternativt fem dagars behandling (LV, 2016). Vid återkommande urinvägsinfektioner är det viktigt att eliminera bakomliggande orsaker för att förhindra återfall (Smee *et al.*, 2013b). I dagsläget finns ingen utarbetad behandlingslängd för urinvägsinfektioner (Weese *et al.*, 2011; Jessen *et al.*, 2015) men senare forskning visar att behandlingslängd på 3 - 5 dagar kan vara aktuellt (Sykes, 2017).

Påverkan på bakterier i urinen vid hantering av urinprov

Bakteriologisk analys av urinprov snarast efter provtagning är rekommendationerna från ISCAID och SVF (SVF, 2009; Weese *et al.*, 2011). Om odling inte kan påbörjas snarast rekommenderas förvaring av provet i kylskåp fram till att det så fort som möjligt kan skickas till laboratorium (Padilla *et al.*, 1981; Lulich & Osborne, 2004; Weese *et al.*, 2011). Frysning av urinprover rekommenderas inte eftersom det leder till att eventuella bakterier inte överlever i frysen. Resultat från studier indikerar att prover äldre än 24 timmar inte bör analyseras då urin anses vara ett bra substrat för bakterier vid förvaring i rumstemperatur och bakterieväxten kan fördubblas var 20 - 45 minut. Andra studier tyder dock på att minskning av bakteriehalter kan förekomma vid förvaring (Bartges, 2004; Lulich & Osborne, 2004; Padilla *et al.*, 1981).

I en studie av Padilla *et al.* (1981) undersöktes hur mängden bakterier förändrades vid förvaring. Odling skedde direkt efter provtagning och sedan efter förvaring i kylskåp eller rumstemperatur efter 2, 4, 6, 12 och 24 timmar och dels efter att prover skickats till laboratorium med post. Av de prover som förvarats i rumstemperatur i 24 timmar visade 65 % (17 av 26 prover) förändrade bakteriehalter. Av proverna hade elva (42 %) gått från bakteriell växt <100 000 CFU/ml till bakteriell växt >100 000 CFU/ml. Bakteriehalterna hade ökat mellan 10 - 10 000 gånger och förändringen av bakteriehalten var kopplad

till den mängd bakterier som fanns från början. Initialt höga halter av bakterier gav högre bakteriehalter efter förvaring. Undantagsvis hade ett prov färre bakterier efter förvaring i rumstemperatur än det initiala provet. Prover förvarade i kylskåp i 24 timmar hade färre förändrade prover med avseende på bakteriehalt än de prover som förvarats i rumstemperatur. Efter förvaring i kylskåp var bakterienivåerna förändrade i 34 % (9 av 26) av proven. Av de förändrade proverna hade bakteriehalterna minskat i sju prover samt ökat i två. Ingen av odlingarna från de 26 prover förvarade i kylskåp resulterade i >100 000 CFU/ml, däremot ändrades växten i ett prov från >100 000 CFU/ml till <100 000 CFU/ml. Urinproverna som analyserades på laboratorium visade liknande förändringar som de prover som förvarats i rumstemperatur. I 27 % (7 av 26) av proverna som skickats till laboratorium hade bakteriehalterna ökat från <100 000 CFU/ml till >100 000 CFU/ml. Padilla *et al* (1981) rekommenderade efter sin studie att prover som inte analyseras direkt ska förvaras i kylskåp i högst sex timmar innan odling påbörjas. Efter den tiden förändrades bakteriehalterna i för stor utsträckning. Liknande rekommendationer gav Lulich och Osborne (2004) vilka ansåg att prover kan förvaras 6 - 12 timmar i kylskåp utan signifikant påverkan på bakterieväxten.

Falskt negativa odlingar kan vara ett resultat från iatrogena baktericida processer som uppstår vid insamling, förvaring eller transporter av urinprov (Lulich & Osborne, 2004). I en studie undersöktes tillsättande av borsyra som konserveringsmedel i urinprov vid fördröjning till odling. Författarna fann dock att ingen fördel fanns med att tillföra borsyra då det var signifikant mer sannolikt att få ett resultat som inte representerade den sanna bakteriella halten i provet (Rowlands *et al.*, 2011).

En pågående antibiotikabehandling kan också förväntas påverka den bakteriella växten både *in vitro* och *in vivo* (Lulich & Osborne, 2004). Urindensiteten kan också påverka bedömningen av urinsediment då det kan vara svårare att upptäcka bakterier och svamp i väldigt utspädd urin (Bartges, 2004).

Sambandet mellan provtagningsmetod och förekomst av bakterier är, som nämnt innan, väl dokumenterad i flertalet studier (Carter *et al.*, 1978; Thomsen *et al.*, 1986; Sørensen *et al.*, 2016; Comer & Ling, 1981) men det saknas publicerade studier på hur den bakteriella växten i ett urinprov efter förvaring ändras. Padilla *et al.* (1981) visade i sin studie att bakterier både kan öka och minska i prov som förvaras innan odling men materialet i studien var litet. Skillnaden av mängden bakterier efter förvaring av urinprov behöver undersökas vidare och dessutom behöver skillnader i förekomsten av bakteriearter i urinprov efter förvaring undersökas. Förmodligen finns risk för feltolkning av provresultat om urinprov förvarats innan odling och det i sig medför en tänkbar risk för feltolkning och överdiagnostisering av UVI. Överdiagnostisering av UVI leder i sin tur till en ökad antibiotikaanvändning och skulle därmed kunna bidra till utvecklandet av antibiotikaresistens.

MATERIAL OCH METODER

Insamling av material

De bakteriologiska undersökningarna utfördes vid enheten för bakteriologi och livsmedelssäkerhet vid institutionen för biomedicin och folkhälsovetenskap vid Sveriges Lantbruksuniversitet (SLU). Provmaterial insamlades från patienter med misstänkt urinvägsinfektion från Universitetsdjursjukhuset (UDS) och Uppsala Veterinärmottagning. Insamling och analys av prover pågick från 2017-03-01 till 2017-11-14. Urinproven hämtades snarast (inom 2 timmar) efter provtagning. Urinprov förvarades i kylskåp från provtagning fram till att urinprovet hämtades. Prov från Uppsala Veterinärmottagning transporterades till laboratorium i sterilt provrör i bil och odlades inom 30 min från att provet hämtats.

Samtliga hundar i studien visade kliniska sjukdomstecken tydande på urinvägsinfektion och inga urval gjordes avseende ras, kön eller ålder. Även urinprov från hundar under pågående antibiotikabehandling inkluderades. Urinprov som djurägare tagit med hemifrån när de besökte kliniken exkluderades. Alla typer av urinprov (spontankastat urinprov, urinprov via cystocentes eller urinprov via kateter) inkluderades i studien. Provmaterialet utgjordes av överbliven urin från patienter som provtagits för diagnostiska undersökningar. Ingen separat etisk ansökan krävdes för genomförandet av denna studie.

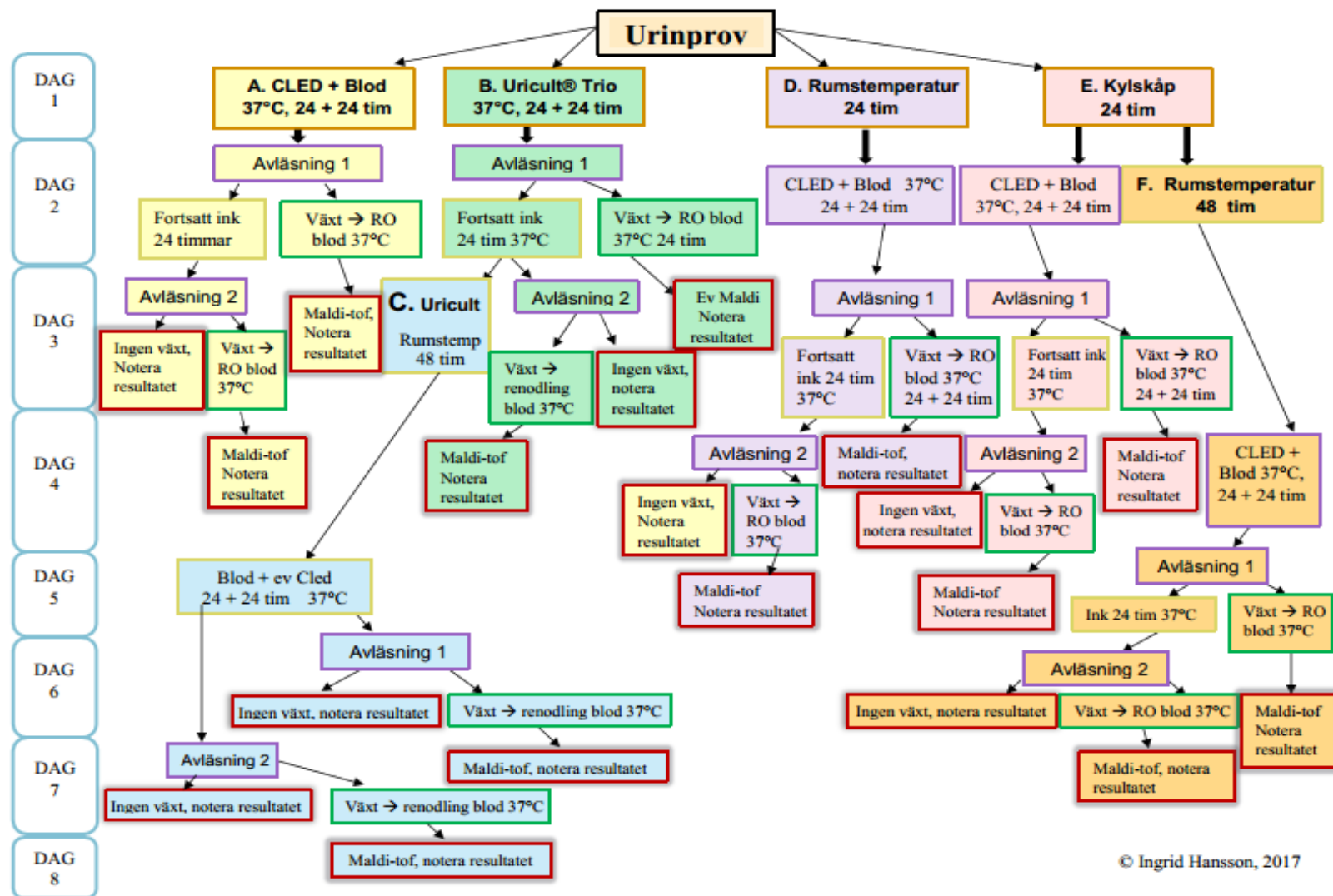
Hantering och odling av urinprov

Urin insamlades och förvarades i sterila provrör. Odling från respektive urinprov utfördes direkt efter provtagning på 5 %-ig hästblod- och CLED-agar samt på Uricult® Trio, då de bakterier som anses relevanta vid UVI växer på dessa substrat. Resterande urin delades upp i sterila rör och förvarades i rumstemperatur och/eller kylskåp. Efter förvaring utfördes odling på blod- och CLED-agar enligt förbestämda standardiserade tidsintervall enligt nedan. Innan all provsättning homogeniserades provet genom att provröret med urin blandades med hjälp av vortex.

Odling och hantering enligt följande tidsschema (Figur 1):

- A. Odling inom 2 timmar efter provtagning på blod- och CLED-agar, inkubering i 24 + 24 timmar i 37°C
- B. Odling inom 2 timmar efter provtagning på Uricult® Trio, inkubering i 24 + 24 timmar i 37°C
- C. Avläsning av Uricult® Trio efter inkubering i 37°C i 48 timmar samt förvaring i rumstemperatur i 48 timmar
- D. Odling på blod- och CLED-agar efter 24 timmar i rumstemperatur, inkubering i 24 + 24 timmar i 37°C
- E. Odling på blod- och CLED-agar efter 24 timmar i kylskåp, inkubering i 24 + 24 timmar i 37°C
- F. Odling på blod- och CLED-agar efter 24 timmar i kylskåp och 48 timmar i rumstemperatur, inkubering i 24 + 24 timmar i 37°C

Steg A representerar odling direkt efter provtagning enligt standardrutin på blod- och CLED-agar. Det är samma metod som utförs på laboratorium och kan anses vara ”gold standard”-metod. Steg B representerar odling direkt efter provtagning men på Uricult® Trio. Detta då det är en vanlig metod som utförs på flertalet kliniker. Steg C är tänkt att simulera odling där Uricult® Trio visat växt på kliniken och som då skickas till laboratorium för verifiering av bakterier och resistensmönster. Steg D och E simulera odling på urinprov som inte odlas direkt efter provtagning, t.ex. när djurägaren har med sig ett urinprov som de samlat hemma. Exempelvis där urinen samlats på morgonen innan veterinärbesök på eftermiddagen eller insamlat på kvällen inför besök på morgonen dagen efter. Vid steg D har provet förvarats i rumstemperatur och vid steg E har provet förvarats i kylskåp. Steg F är tänkt att simulera de tillfällen då odling inte kan sättas direkt och där urin istället skickas med post till laboratorium. Urinen förvaras i kylskåp fram till att det postas och sedan två dagars transport i rumstemperatur till laboratorium innan analysen påbörjas.



© Ingrid Hansson, 2017

Figur 1. Flödesschema över de olika hanterings- och odlingsstegen i denna studie.

Utförande av steg A, D, E och F

Urin ströks enligt standardrutin med primär-, sekundär- och tetriärstryk med en blå ögla (0,01ml) på hästblodagar. Blodagar användes för att påvisa aeroba och fakultativt aeroba bakterier. För att kvantifiera växten användes även CLED-agar. En vit ögla (1 µl) doppades i urinen och därefter fördelades urinen (1 µl) i tre droppar på CLED-plattan. Genom att dra streck med ögla genom dropparna fördelades urinprovet på hela agarytan, och antalet bakteriekolonier kunde uppskattas. CLED-agar är ett tillväxtmedium som används på ackrediterade laboratorier såsom SVA, vid differentiering av bakterier som orsakar urinvägsinfektion. CLED-agar innehåller inte elektrolyter så den används bland annat för att hindra bakterier såsom *Proteus* spp. att svärma. Laktosfermenterande bakterier såsom *E. coli* och de flesta *Klebsiella* spp. fermenterar laktos (som ingår i CLED-agar) varvid gula kolonier och ett synligt gult färgomslag på agarn påvisas.

Samtliga prov inkuberades i 37°C ± 1°C i aerob miljö i 24 + 24 timmar (Figur 1).

Utförande av steg B

Urin flöddes över båda sidorna på doppglas Uricult® Trio och inkuberades därefter i 37°C ± 1°C i aerob miljö i 24 + 24 timmar (Figur 1). Doppglas är ett odlingsmedium som används för att påvisa mikroorganismer i vätskor. I denna studie användes Uricult® Trio. På Uricult® Trio består ena sidan av CLED-agar medan andra sidan är uppdelad i två fält, MacConkey-agar som täcker halva ytan och *E. coli*-agar som täcker andra halvan. MacConkey-agar selekterar fram gramnegativa bakterier och på *E. coli*-agar kan *E. coli* producera β-glukoronidas vilket ger brunsvarta kolonier. Andra bakterier som växer på denna agar ger inte färgomslag.

Utförande av steg C

Efter inkubering av Uricult® Trio i 37°C ± 1°C i aerob miljö i 24 + 24 timmar togs Uricult® Trio ut och placerades i rumstemperatur fram till avläsning efter 48 timmar (Figur 1).

Identifiering av bakterier

Efter inkubering renodlades de bakterier som vuxit fram på blod- och CLED-agar eller på Uricult® Trio. Renodling utfördes på hästblodagar vilka inkuberades i 37°C ± 1°C och avlästes efter 24 ± 3 timmar. Därefter identifierades bakterieart med hjälp av Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry (Maldi-Tof MS). Maldi-Tof skapar ett masspektrum vilken sedan jämförs mot en referensdatabas med kända bakteriers masspektrum, ett värde mellan noll och tre erhålls som visar hur väl bakteriens spektrum stämmer överens med referensdatabasen från en känd bakterie, varvid bakterien i det aktuella provet identifieras. Varje utvald koloni analyserades två gånger. Score-värde >2,0 krävdes vid minst en analys för att resultatet skulle anses tillförlitligt.

Identifiering av antal arter

Den bakteriella växten klassades som renkultur (en art, samma makromorfologi på samtliga kolonier) eller ≥ två arter (mer än en makromorfologi påvisad bland kolonierna) baserat på koloniernas makromorfologi.

Beräkning av antalet bakterier

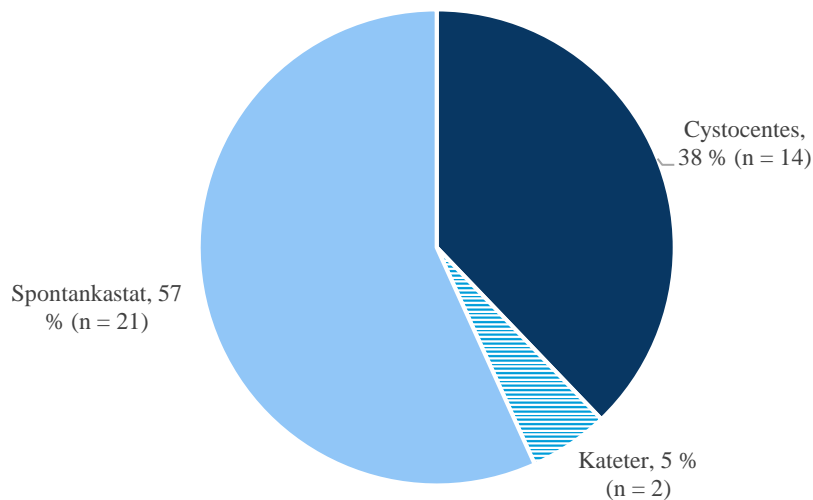
Uträkning och bedömning av antalet CFU/ml utfördes på CLED-agar genom beräkning av totalantalet bakteriekolonier som växte på plattan vilket multiplicerades med 1000, eftersom den spridda provvolymen var 1 µl. Därmed motsvarar 1 koloni på plattan 1000 CFU/ml. I många fall förekom höga halter av bakterier och en överslagsräkning utfördes för att uppskatta antal CFU/ml, vanligtvis genom att dela in CLED-agar i åtta tårtbitar, räkna en tårtbit och sedan multiplicera med åtta för att få ett ungefärligt värde på antal CFU/ml.

Mängden bakteriell växt på blod- och CLED-agar klassificerades som antingen avsaknad av växt (0 CFU/ml), sparsam (≤25 000 CFU/ml), måttlig (25 000 – 100 000 CFU/ml), riklig (≥100 000 CFU/ml)

eller oläslig växt. Bedömning av mängd bakterier på Uricult® Trio gjordes enligt tillverkarens instruktioner. Alla resultat noterades kontinuerligt i ett Excel-dokument.

RESULTAT

Insamlat material



Figur 2. Fördelning av insamlade prover (N = 37) baserat på provtagningsmetod.

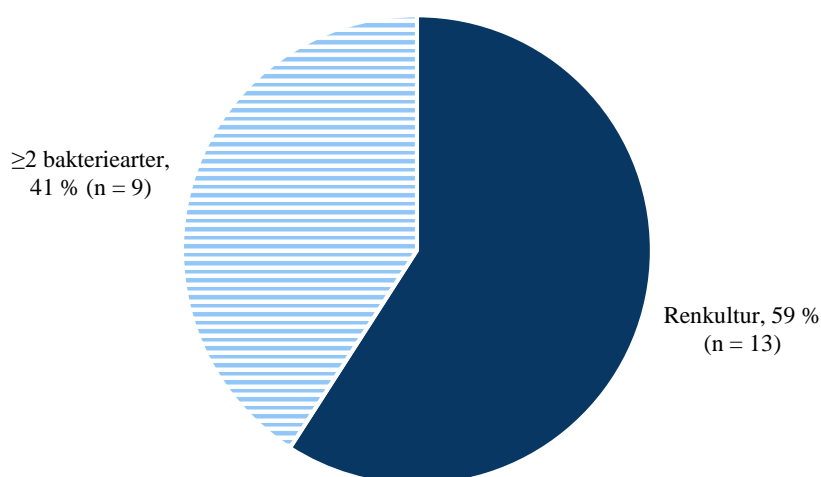
Totalt analyserades 37 prover från 35 hundar, 28 prover kom från Universitetsdjursjukhuset och nio prover kom från Uppsala Veterinärmottagning. Proverna var tagna via cystocentes, kateter eller genom spontankastat prov (Figur 2). Av dessa var 27 (73 %) prov från tikar och 10 (27 %) prov från hanar. Från tikarna var 10 prover insamlade via cystocentes. Resterande 17 prover var spontankastade. Av proverna från hanhundar var fyra prover insamlade via cystocentes, fyra var spontankastade prover och två prover var insamlade via kateter.

Från två tikar togs både cystocentes och spontankastat prov vid samma tillfälle (prov 18 och 19 respektive 35 och 36, Bilaga 1, Tabell 3).

Initial odling på blod- och CLED-agar (A)

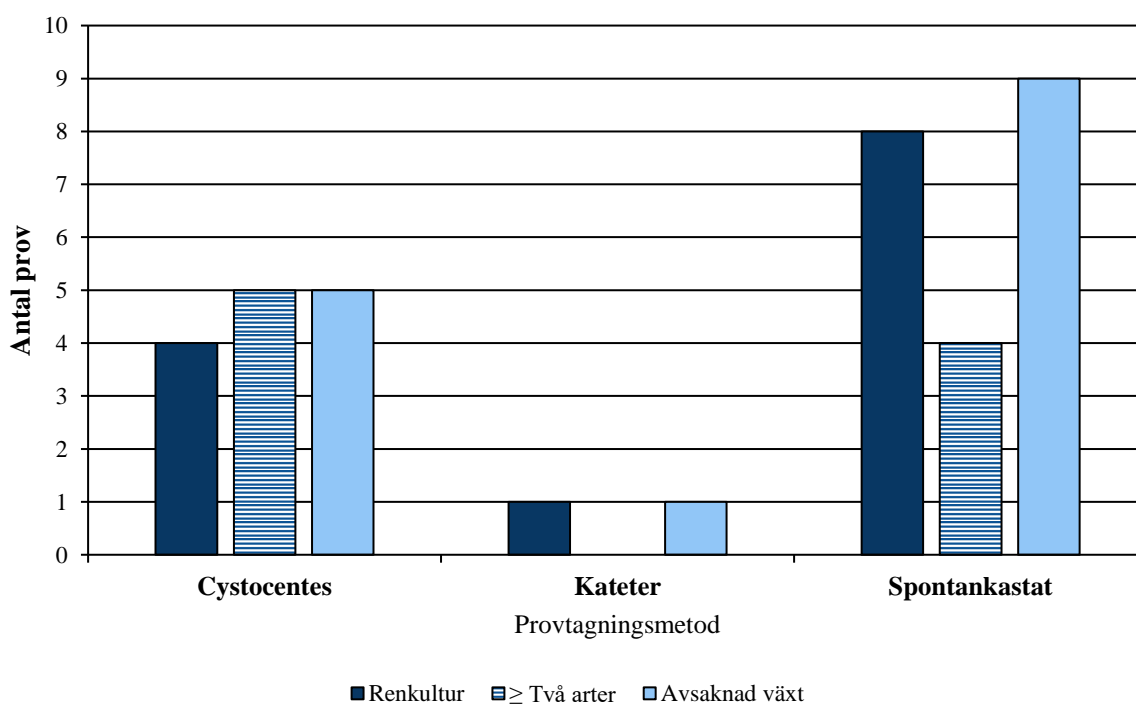
Vid avläsning av den initiala odlingen på blod- och CLED-agar (A) påvisades växt av bakterier i 22 av 37 prover (59,5 %). I nio av dessa 22 prover påvisades \geq två olika bakterier baserat på makromorfologi (Figur 3). Med hjälp av Maldi-Tof typades makromorfologiskt skilda kolonierna som samma bakterieart i fem av nio prov. De arter som identifierades var *E. coli* och *S. pseudintermedius*. Eftersom Maldi-Tof identifierar bakterier på artnivå går det inte avgöra om det var samma bakterie eller samma bakterieart men av olika stammar. I resterande fyra prover identifierade Maldi-Tof bakteriekolonierna som olika arter.

I resterande tretton prover påvisades en bakterieart både makromorfologiskt och med hjälp av Maldi-Tof (Figur 3), dessa klassades som renkultur.



Figur 3. Fördelning mellan renkultur och \geq två bakteriearter efter initial odlingen på blod- och CLED-agar (A) baserat på makromorfologi (N = 22).

Oavsett om provet var taget via cystocentes eller spontankastat kunde bakteriell växt i renkultur, med två eller fler arter eller med avsaknad av växt identifieras. För prov tagna via kateter identifierades renkultur samt avsaknad av växt (Figur 4). Provet med renkultur förekom i sparsam växt med en bakterieart som bedömdes utan klinisk relevans.



Figur 4. Fördelning av prover med avsaknad av växt, renkultur eller \geq två bakteriearter baserat på provtagningsmetod (N = 37) efter initial odling på blod- och CLED-agar (A).

Identifierade bakteriearter vid initial odling

Escherichia coli (*E. coli*) var den vanligast förekommande bakterien och påvisades i 15 av 22 prover med växt (68 %). Näst vanligast var *Staphylococcus pseudintermedius* (*S. pseudintermedius*) som förekom i 6 av 22 prover (27 %). Övriga påvisade bakteriearter som bedömdes kunna vara potentiellt

kliniskt relevanta var *Enterococcus faecalis* (*En. faecalis*), *Staphylococcus* spp. (*S. intermedius*, *S. delphini*) och *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*).

Bakterier som påvisades men bedömdes med största sannolikhet vara utan klinisk relevans var *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *Streptococcus canis* (*St. canis*), *Micrococcus luteus* (*M. luteus*) samt *Lelliottia amnigena* (*L. amnigena*). Proven var tagna via cystocentes, kateter eller spontankastat prov. I de prover som dessa bakterier påvisades förekom samtliga i sparsam växt (Bilaga 1, Tabell 3).

Skillnad i bakteriell växt mellan initial odling på blod- och CLED-agar (A) och odling efter förvaring i rumstemperatur och/eller kylskåp (D, E och F)

Vid avläsning av den initiala odlingen på blod- och CLED-agar (A) påvisades (som ovan nämnts) ingen bakteriell växt i 15 av 37 prover (40,5 %). Odlingar från 12 av de 15 proverna var fortsatt negativa avseende bakteriell växt efter vidare förvaring av provet, oavsett om urinen förvarats 24 timmar i rumstemperatur (D) eller kylskåp (E) eller 24 timmar i kylskåp och sedan 48 timmar i rumstemperatur (F).

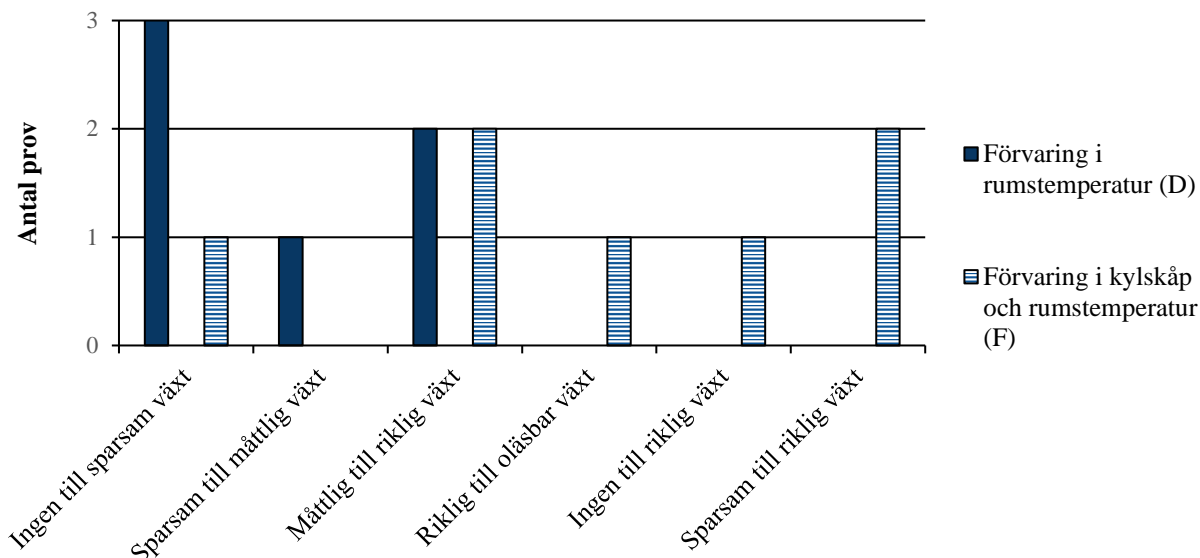
I de tre prov där bakteriell växt tillkom efter förvaring hade alla förvarats i rumstemperatur (D). Den bakteriella växten klassades som sparsam i samtliga tre prover, och i ett prov påvisades en potentiellt patogen bakterieart (*S. pseudintermedius*). Två prover var spontankastade, det tredje var ett prov taget via cystocentes. Bakteriell växt tillkom också i två av de spontankastade proverna efter att de både förvarats i kylskåp och i rumstemperatur (F). I ett av proverna påvisades en potentiellt patogen bakterie (*S. pseudintermedius*) i sparsam mängd.

Skillnad i mängd bakterier efter förvaring

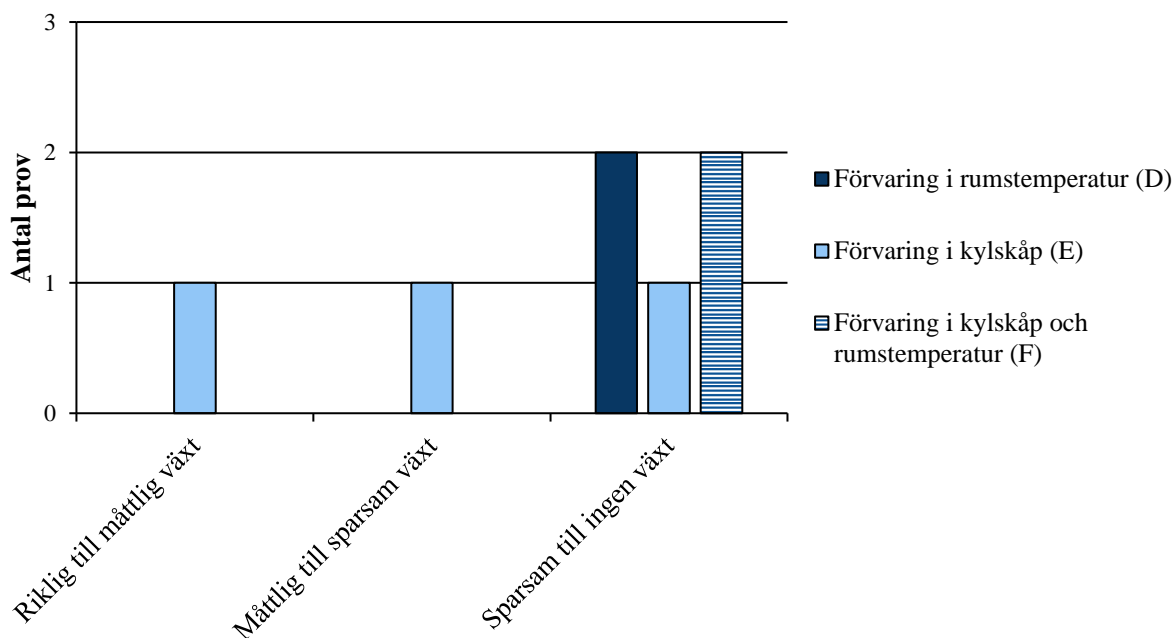
Förvaring av urinprover påverkade i ett antal fall resultatet avseende klassificeringarna ”avsaknad av”, ”sparsam”, ”måttlig” eller ”riklig” växt. Inget entydigt mönster kunde påvisas för hur förändring av mängden bakterier förändras efter förvaring men flest prov som ökade till riklig mängd hade förvarats i kylskåp och rumstemperatur (F), inget prov som förvarats i kylskåp (E) resulterade i en ökning i klassifikation (Figur 5 och 6). Skillnaden i bakteriell växt efter förvaring verkade inte påverkas nämnvärt av provtagningsmetod (Tabell 1). Totalt ändrades klassificeringen i 8 av 37 (21,5 %) prover som förvarats i rumstemperatur 24 timmar innan odling (D), i 3 (8 %) av de prover som förvarats i kylskåp i 24 timmar innan odling (E) samt i 9 (24,5 %) av de prover som förvarats både i kylskåp i 24 timmar samt rumstemperatur i 48 timmar innan odling (F) (Figur 5 och 6).

Tabell 1. Förekomst av mängd bakterie vid direkt odling samt efter förvaring

		Initial odling från urinprov (A)	Odlingar efter förvaring i rumstemperatur (D)	Odlingar efter förvaring i kylskåp (E)	Odlingar efter förvaring i kylskåp samt rumstemperatur (F)
Cystocentes	Sparsam	1	1	1	0
	Måttlig	2	0	1	0
	Riklig	6	8	6	8
Spontankastat	Sparsam	5	6	5	4
	Måttlig	0	1	2	0
	Riklig	7	7	5	10
Kateter	Sparsam	1	0	1	0
	Måttlig	0	0	0	0
	Riklig	0	0	0	0
Totalt antal prov		37	37	37	37



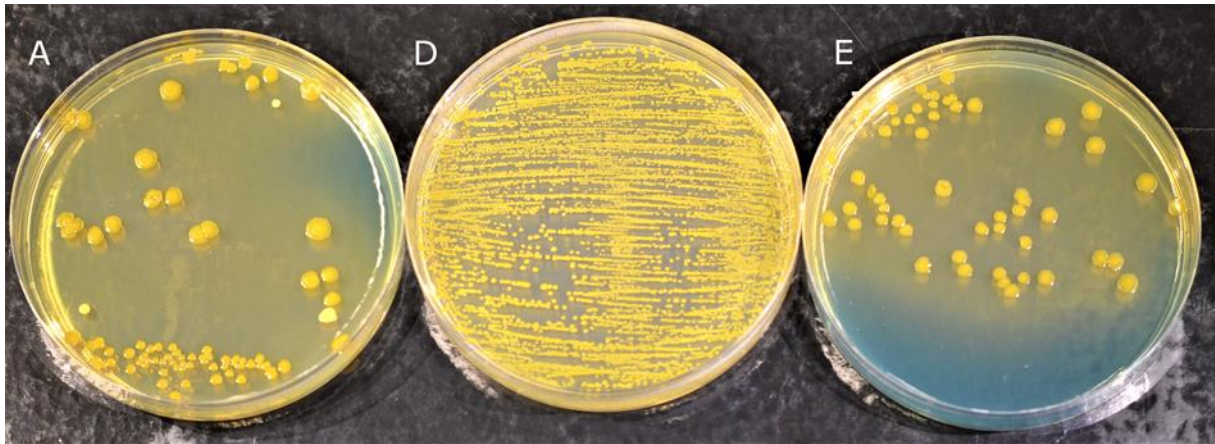
Figur 5. Antal prov med ökat bakterieantal efter förvaring som resulterade i ändring i klassificering.



Figur 6. Antal prov med minskat bakterieantal efter förvaring som resulterade i ändring i klassificering.

Om totalt antal CFU/ml jämfördes förändrades bakteriehalterna i fler fall än de ovan nämnda. Efter förvaring i rumstemperatur (D) förändrades halterna i 21 (57 %) prov, 16 prov ökade i antal CFU/ml och 5 prov minskade i antal CFU/ml. Efter förvaring i kylskåp (E) förändrades 19 (51 %) prov, i sex prov ökade antal CFU/ml och i 13 prov minskade antal CFU/ml. Efter förvaring i kylskåp och rumstemperatur (F) förändrades halterna i 23 (62 %) prov, i 18 prov ökade antal CFU/ml och i fem prov minskade antal CFU/ml.

I de prov där bakterier förökade sig efter förvaring, ökade antalet CFU/ml med ca 10 – 100 gånger i jämförelse med halten från början. De flesta av dessa prover innehöll riklig mängd bakterier (>100 000 CFU/ml) redan vid den initiala odlingen (Bilaga 1, Tabell 3). En trend som observerades var att prover ofta ökade i antal CFU/ml efter förvaring i rumstemperatur (D) och efter förvaring i kylskåp och rumstemperatur (F) men minskade eller var oförändrade efter förvaring i kylskåp (E) (Figur 7).

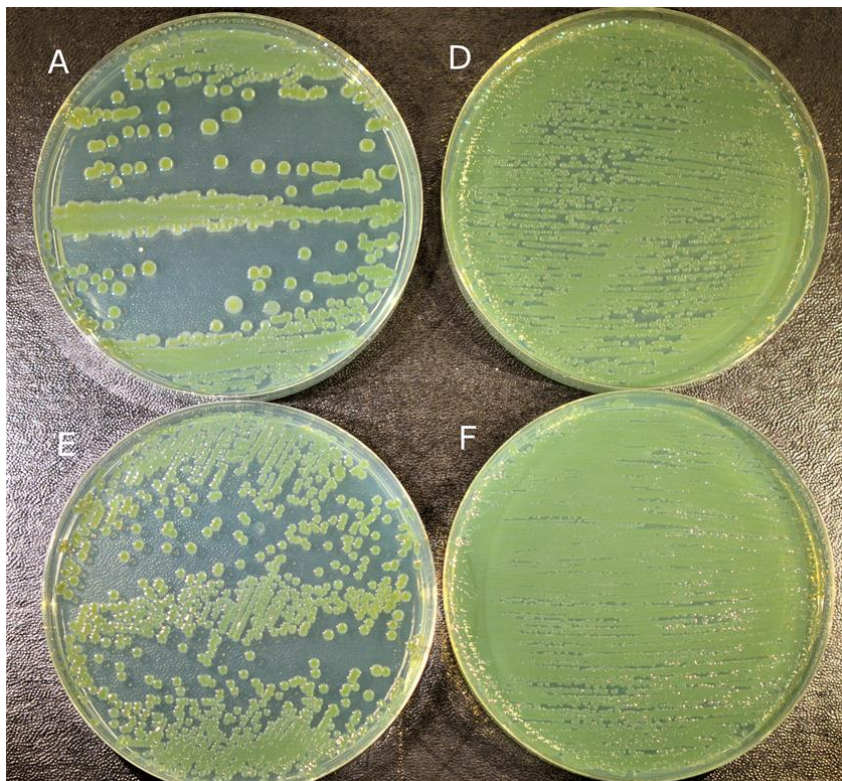


Figur 7. Tre CLED-plattor från samma urinprov som tydligt visar förändringen av växt beroende på förvaring av urinprovet fram till odling. A. odling direkt efter insamling, D. växt efter att provet förvarats 24 timmar i rumstemperatur, E. växt efter förvaring 24 timmar i kylskåp.

Avläsning och tolkning av bakteriell växt på blod- och CLED-agar

Proteus spp. påvisades i ett urinprov och svärmade på samtliga blodagarplattor vilket gjorde att och andra bakterier på samma agarplatta inte kunde identifieras. *Proteus* spp. identifierades inte på någon CLED-agar eller Uricult® Trio.

Mängden bakterier kunde inte kvantifieras på en CLED-agar (odling från prov som förvarats i kylskåp 24 timmar och rumstemperatur 48 timmar (F) innan odling). Provet gick inte att bedöma eftersom enskilda kolonier inte kunde särskiljas och antalet CFU/ml kunde därmed heller inte bedömas (Figur 8).



Figur 8. Fyra CLED-plattor från samma urinprov som visar förändringen av bakteriell växt (*E. coli*) beroende på förvaring av urinprov innan odling. A. Initial odling. D. Odling efter 24 timmar i rumstemperatur. E. Odling efter 24 timmar i kylskåp. F. Odling efter 24 timmar i kylskåp plus 48 timmar i rumstemperatur (F). Fermentering av laktos med gult omslag kunde observeras över hela agarplattan efter 24 timmar men efter 48 timmar hade färgen skiftat till grönblått.

Skillnad i förekomst av potentiellt patogena bakteriearter

I några prover påvisades skillnad i förekomsten av potentiellt patogena arter efter förvaring (D, E och F) jämfört med vid initial odling på blod- och CLED-agar (A). Vanligast var att en art antingen påvisades eller inte längre påvisades i ett prov efter förvaring, men i enstaka prover förekom skillnad med två arter (Tabell 2).

Skillnad i förekomst av potentiellt patogena arter efter förvaring skedde i tre (8 %) prov som förvarats i rumstemperatur (D), i tre (18 %) prover som förvarats i kylskåp (E), i sex (16 %) av proven som förvarats i kylskåp och rumstemperatur (F) i jämförelse med initial odling på blod- och CLED-agar (A). Potentiellt patogena arter som påvisades efter förvaring men som inte påvisades i provet innan tillhörde arterna *E. coli* och *S. pseudintermedius*. Arter som inte kunde påvisas efter förvaring trots att de förekom innan var *En. Fecalis*, *E. coli* och *S. pseudintermedius*. Av proverna med förändring var urinen insamlad via cystocentes eller via spontankastat prov (Bilaga 1, tabell 3).

Tabell 2. Skillnad i förekomst av antal potentiellt patogena bakteriearter efter förvaring i kylskåp och/eller rumstemperatur jämfört med initial odling

	Antal urinprov med förändring av potentiellt patogena bakterier	Ytterligare potentiellt patogena arter som påvisades efter förvaring	Potentiella patogena arter som inte längre påvisades efter förvaring
Initial odling (A) vs odling efter förvaring i rumstemperatur (D)	2 (5%)	2	1
Initial odling (A) vs förvaring i kylskåp (E)	3 (8%)	2	1
Initial odling (A) vs förvaring i kylskåp samt rumstemperatur (F)	5 (13%)	3	3

Ytterligare påvisade bakteriearter i urinprov efter förvaring

Bakteriearter som påvisades efter förvaring men bedömdes vara utan klinisk relevans var *Pseudomonas flavescens* (*Ps. flavescens*), *Stenotropomonas* spp., *Pantoea agglomerans* (*Pa. agglomerans*), *S. saprophyticus*, *S. hominis*, *S. epidermidis*, *En. canintestin*, *Actinobacter lwoffii* (*A. lwoffii*) samt *Bravendimonas dimenuta* (*Br. dimenuta*). De flesta förekom i sparsam växt men *Stenotropomonas* spp., *Br. dimenuta* och *S. saprophyticus* förekom i riklig mängd i prov med \geq två arter, samtliga prover hade förvarats i kylskåp 24 timmar och därefter i rumstemperatur 48 timmar innan odling (F). Proverna var spontankastade prover eller prov tagna via cystocentes.

Skillnad i bakteriell växt mellan de initiala odlingsätterna (A och B)

I totalt 27 (73 %) av 37 prover gav initial odling på Uricult® Trio (B) samma resultat avseende bakteriell växt, identifiering av patogena bakterier samt bedömning av koloniernas makromorfologi som den initiala odlingen på CLED-agar (A).

I tre prover förekom växt på blod- och CLED-agar (A) men ingen växt på Uricult® Trio (B). De bakterier som identifierades på odling (A) var *E. coli*, *S. warneri* och *M. luteus*. I samtliga fall var den bakteriella växten sparsam (<4 000 CFU/ml) och i renkultur. *E. coli* förekom i ett spontankastat prov, *S. warneri* i ett prov taget via kateter och *M. luteus* i ett prov taget via cystocentes.

I två prover förekom ingen växt vid initial odling (A) men där bakteriell växt påvisades på Uricult® Trio (B). I dessa två prover förekom enstaka kolonier på Uricult® Trio där *L. Amnigena* identifierades i ett fall och *S. pseudintermedius* i det andra. I båda fallen var proverna spontankastade.

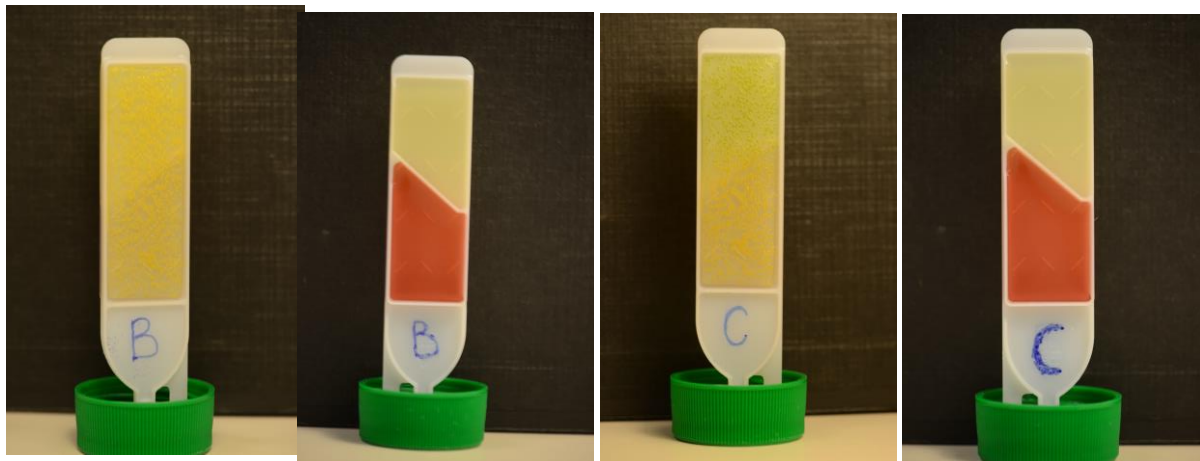
I 19 prov kunde växt påvisas vid båda de initiala odlingssätten. Odlingar på blod- och CLED-agar (A) klassades som renkultur i tio av 19 prover medan odlingar på Uricult® Trio (B) klassades som renkultur i 15 av 19 odlingar.

Skillnad i förekomst av potentiellt patogena arter

Totalt skiljde sig potentiella patogena arter i sex prover vid jämförelse mellan Uricult® Trio (B) och initial odling på blod- och CLED-agar (A). *Staphylococcus pseudintermedius* påvisades i ett prov på Uricult® Trio men inte på initial odling på blod- och CLED-agar, provet var spontankastat. De bakteriearter som inte kunde påvisas på Uricult® Trio var *En. Fecalis*, *P. mirabilis*, *S. pseudintermedius* och *E. coli*. Proverna var insamlade via cystocentes eller spontankastat prov. Samtliga bakteriearter som inte kunde påvisas på Uricult® Trio förekom i sparsam växt på initial odling på blod- och CLED-agar (A) (Bilaga 1, Tabell 3).

Avläsning och tolkning av Uricult® Trio

Ingen skillnad detekterades vid tolkning bakteriemängd och förekomst av arter mellan Uricult® Trio som inkuberats i 48 timmar (B) och Uricult® Trio som inkuberats i 48 timmar och sedan förvarats i rumstemperatur i 48 timmar (C) (Figur 9).



Figur 9. Initial odling på Uricult® Trio vid avläsning efter 48 h (B) samt Uricult® Trio vid avläsning efter initial odling samt förvaring i 48 timmar i rumstemperatur (C) från samma prov. I detta prov påvisades *S. pseudintermedius* i renkultur.

DISKUSSION

Resultatet från denna studie tyder på att urinprov ska förvaras i kylskåp fram till analysstart för att minimera risken för felbedömning, då inget av proverna förvarade i kylskåp resulterade i en ökning till klassificeringen riklig växt. Dessutom förändrades mängden bakterier i proverna i lägst utsträckning i prover förvarade i kylskåp. Fler prov förvarade i rumstemperatur resulterade i ökning av bakteriemängd inklusive ändrad klassificering till riklig växt. Detta i sig leder till en risk för överdiagnostisering av urinvägsinfektioner om urinprov förvarats i rumstemperatur innan odling om de gamla kriterierna för diagnostisering av UVI används. De förändringar i mängd bakterier efter förvaring som sågs i denna studie överensstämmer med resultaten från studien utförd av Padilla *et al* (1981) där större delen av de prov som förvarades i rumstemperatur eller skickades till laboratorium hade ökat i mängd bakterier medan prov i kylskåp förändrades i lägre utsträckning. Sammanfattningsvis tyder detta på att odling av urinprover som förvaras i kylskåp verkar stämma bäst överens med odling från färskt urinprov samt resultera i minst antal feltolkningar av mängden bakterier och därmed minska risken för onödig antibiotikaanvändning. Urinprov som inte kan analyseras direkt bör därför fortsatt förvaras i kylskåp fram till analys, men inte under längre tid än 24 timmar, vilket även har rekommenderats tidigare (Lulich & Osborne, 2004; Padilla *et al.*, 1981; Weese *et al.*, 2011).

Baserat på resultat i denna studie och i Padilla *et al.* (1981) studie verkar urin vara ett bra substrat för bakterier att växa till i, speciellt vid förvaring i rumstemperatur. Tillväxten av bakterier är kopplad till den mängd bakterier som fanns från start då det sker en logaritmisk tillväxt av bakterierna, vilket innebär att prov med lågt antal bakterier inte förändras i samma utsträckning som ett prov med högt antal. Det kan bli problematiskt vid tolkning av odlingar från urinprov med måttlig mängd bakterier som förvaras innan kvantitativ odling, eftersom risk för feltolkning ökar. Det finns även risk att bakterierna växer till i sådan utsträckning att det efter förvaring inte går att kvantifiera mängden bakterier (Figur 8) eller identifiera relevanta bakterier och deras resistensmönster. Risken för feltolkning av mängd bakterier är framförallt i prov som lätt kontamineras, såsom spontankastade prover. Om kontaminanter förekommer i <100 000 CFU/ml men efter förvaring tillväxt så pass att de förekommer med >100 000 CFU/ml klassas detta enligt den gamla klassificeringen som en signifikant bakteriuri och flera fall skulle då troligtvis resultera i diagnosen urinvägsinfektion. Risken för överdiagnostisering bör dock minska om den nya terminologin används. Dock innebär detta att kvantitativa odlingar inte är användbara vid odling från prov som förvarats innan analys då studier sedan tidigare har visat att kontaminanter från spontankastade prov kan representera >10 000 CFU/ml (Carter *et al.*, 1978; Comer & Ling, 1981). Det har även konstaterats tidigare att kvantitativa odlingar enbart är av hjälp om odling sker direkt efter provtagning (Comer & Ling, 1981; Padilla *et al.*, 1981; Sørensen *et al.*, 2016).

Proteus spp. är en bakterie som anses vara en vanlig orsak till urinvägsinfektion hos hund (Ling, 1984; Seguin *et al.*, 2003; Tivipasi *et al.*, 2009; Windahl, 2014). *Proteus* spp. förekom endast i ett prov i denna studie och kunde då identifieras på alla blodagarplattor men inte på någon CLED-agar eller Uricult® Trio. Detta tyder på att en risk att missa *Proteus* spp. vid användning av dessa odlingsmedier finns men det är svårt att bedöma hur ofta detta sker utifrån materialet i denna studie. Om enbart blodagar skulle användas finns däremot en risk för svårbedömda odlingsresultat speciellt vid blandflora med *Proteus* spp. Det är även svårt att bedöma den kliniska relevansen och vilka skillnader som kan ske efter förvaring i ett urinprov med *Proteus* spp. Tänkbart är även att fler prov skulle varit svårbedömda efter förvaring av urinprov om *Proteus* spp. förekom i provet.

Förekomsten av patogena arter skilde sig endast i tio av 111 odlingar (9 %) vid jämförelse av resultat från den initiala odlingen på blod- och CLED-agar (A) med odling efter förvaring av urinprov i kyl och/eller rumstemperatur (D, E, F). Skillnaden påvisades främst i spontankastade prov men förekom även i prov tagna via cystocentes. Baserat på detta verkar kliniskt relevanta förändringar avseende vilka bakteriearter som påvisas i ett urinprov efter förvaring, enligt de sätt som förekommer i studien, ske i viss utsträckning. Störst risk verkar finnas vid spontankastade prover vilket kan kopplas till en ökad risk för kontaminering av prover vid användande av denna provtagningsteknik, vilket har setts i tidigare studier där sambandet mellan provtagningsteknik och bakteriell växt undersökts (Carter *et al.*, 1978;

Comer & Ling, 1981). Däremot har inga tidigare publicerade artiklar hittats som undersökt skillnaden i förekomst av patogena arter i urinprov som förvarats och resultatet kan därför inte jämföras med tidigare studier. Antal undersökta prov i denna studie är dock få, och ytterligare studier med större material behövs.

Skillnad i påvisandet av potentiellt patogena arter mellan de två olika initiala odlingsätten (A och B) förekom dock mer frekvent. De flesta prover var spontankastade men det förekom även i några prov tagna via cystocentes. Det som framförallt förekom var att arter som påvisades vid initial odling på blod- och CLED-agar (A) inte påvisades på Uricult® trio (B). Vid samtliga tillfällen kunde dock andra potentiellt patogena arter påvisas på Uricult® Trio i riklig mängd. Detta tyder sammantaget på att risken att missa en relevant bakteriuri är låg vid användning av Uricult® Trio men att det finns en risk att missa arter när provet innehåller \geq två arter. Identifiering av agens på blod- och CLED-agar kan dock i sig innebära en ”för bra” identifiering av bakterier då även kontaminanter i lågt antal identifieras. Tänkbar klinisk betydelse kan finnas om en missad bakterie är relevant och visar sig ha annat resistensmönster än de påvisade bakterierna men den kliniska relevansen är inte undersökt.

Baserat på resultatet i denna studie verkar Uricult® Trio fungera bra avseende att bibehålla samma bakteriell växt trots förvaring i rumstemperatur. Eftersom Uricult® Trio förvaras i en försluten behållare är risken för kontaminering från omgivningen liten vilket gör det svårare för bakterier att tillkomma efter provsättning. Endast bakterier som funnits vid provsättning kan växa ut på plattorna, förutsatt att behållaren inte är kontaminerad. Detta innebär i praktiken att det som odlas fram på klinik på Uricult® Trio kommer vara samma bakterier som identifieras vid verifiering på laboratorium trots att de skickats på posten med ovisshet om förvaringstid och temperatur. Intressant hade varit att undersöka om odling på Uricult® Trio direkt efter provtagning skulle skilja sig mot odling på Uricult® Trio från urinprov som förvarats enligt de förbestämda tidsintervallen och om detta skulle resultera i någon skillnad.

För- och nackdelar påvisades för båda metoderna som simulerade att prov skickades till laboratorium. Uricult® Trio var sämre på att påvisa om \geq två patogena arter förekom i samma prov till skillnad mot analys av urin som skickats i provrör och sedan odlades på laboratorium. I vissa avseenden kanske odling på blod- och CLED-agar till och med är ”för bra” på att identifiera arter då även kontaminanter i sparsam växt påvisas. Förekomst av mängd bakterier förändrades dock i stor utsträckning i odlingar från urin i provrör medan tolkningen av mängden bakterier på Uricult® Trio inte ändrades. Vid förvaring av urin finns även risk att kontaminanter gynnas och växer till. Uricult® Trio kan baserat på resultaten i denna studie inte anses lika bra som gold-standardmetoden vilket även påvisades för doppglas i studien av Ybarra *et al.* (2014). Ybarra *et al.* (2014) rekommenderar att ett urinprov bör skickas som komplement till laboratorium för verifiering av arter om doppglas används. Baserat på resultatet i denna studie rekommenderas att i första hand odla på blod- och CLED-agar på färsk urin om möjlighet och kompetens finns. Saknas möjlighet anses Uricult® Trio vara en bra alternativ metod, vilken därför rekommenderas som alternativ till att skicka urin på posten.

Med hjälp av Maldi-Tof identifierades makromorfologiskt skilda kolonier som samma bakterieart i fem prover. Eftersom Maldi-Tof identifierar bakterier på artnivå är det inte möjligt att avgöra om bakterierna är en och samma, eller olika, stammar av samma bakterieart. De arter som skiljde sig på detta sätt mellan makromorfologi och Maldi-Tof var *E. coli* eller *S. pseudintermedius*. Det är inte omöjligt att det kan röra sig om olika stammar men varken fenotypning eller resistensmönster undersöktes hos bakterierna i denna studie. Den kliniska betydelsen går inte att säga något om, men det skulle möjligen kunna ha klinisk relevans i de fall bakteriéstammarna eller arterna visar sig ha olika resistensmönster. I enstaka prov påvisades även \geq två olika potentiellt patogena bakteriearter. Det har påvisats tidigare i flertalet studier att fler än en patogen bakterieart kan vara orsak till infektion (Wooley & Blue, 1976; Ling, 1984; Ling *et al.*, 2001; Rowlands *et al.*, 2011) vilket även kan ha varit fallet i denna studie.

KONKLUSION

Resultaten från denna studie stödjer tidigare rekommendationer att ett urinprov som inte kan analyseras direkt bör förvaras i kylskåp fram till påbörjande av odling. Om kvantitativ odling önskas bör odlingen ske snarast efter provtagning, oavsett förvaringsmetod, för att få tillförlitliga resultat. Kan odling inte ske på kliniken och urin behöver skickas till laboratorium för analys finns risk för felbedömning av mängd bakterier. Att skicka Uricult® Trio till laboratorium är ett bra alternativ till att skicka urin om odling av Uricult® Trio kan ske på kliniken då Uricult® Trio är bra på att identifiera bakteriuri.

REFERENSER

- Ball, K. R., Rubin, J. E., Chirino-Trejo, M. and Dowling, P. M. (2008). Antimicrobial resistance and prevalence of canine uropathogens at the Western College of Veterinary Medicine Veterinary Teaching Hospital, 2002-2007. *Canadian Veterinary Journal-Revue Veterinaire Canadienne* 49 (10), 985-990.
- Bartges, J. W. (2004). Diagnosis of urinary tract infections. *Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice* 34 (4), 923-933.
- Carter, J. M., Klausner, J., S., Osborne, C., A., Bates, F. Y. (1978). Comparison of collection techniques for quantitative urine culture in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 173 (3), 296-298.
- Cohn, L. A., Gary, A. T., Fales, W. H. and Madsen, R. W. (2003). Trends in fluoroquinolone resistance of bacteria isolated from canine urinary tracts. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 15 (4), 338-343.
- Comer, K. M. and Ling, G. V. (1981). Results of urinalysis and bacterial culture of canine urine obtained by antepubic cystocentesis, catheterization, and the midstream voided methods. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 179 (9), 891-895.
- Jessen, L. R., Sorensen, T. M., Bjornvad, C. R., Nielsen, S. S. and Guardabassi, L. (2015). Effect of antibiotic treatment in canine and feline urinary tract infections: A systematic review. *Veterinary Journal* 203 (3), 270-277.
- Ling, G. V. (1984). Therapeutic strategies involving antimicrobial treatment of the canine urinary-tract. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 185 (10), 1162-1164.
- Ling, G. V., Norris, C. R., Franti, C. E., Eisele, P. H., Johnson, D. L., Ruby, A. L. and Jang, S. S. (2001). Interrelations of organism prevalence, specimen collection method, and host age, sex, and breed among 8,354 canine urinary tract infections (1969-1995). *Journal of Veterinary Internal Medicine* 15 (4), 341-347.
- Lulich, J. P. and Osborne, C. A. (2004). Urine culture as a test for cure: why, when, and how? *Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice* 34 (4), 1027-1041.
- McGhie, J. A., Stayt, J. and Hosgood, G. L. (2014). Prevalence of bacteriuria in dogs without clinical signs of urinary tract infection presenting for elective surgical procedures. *Australian Veterinary Journal* 92 (6), 225-225.
- Norris, C. R., Williams, B. J., Ling, G. V., Franti, C. E., Johnson, D. L. and Ruby, A. L. (2000). Recurrent and persistent urinary tract infections in dogs: 383 cases (1969-1995). *Journal of the American Animal Hospital Association* 36 (6), 484-492.
- Padilla, J., Osborne, C. A., Ward, G. E. (1981). Effects of storage time and temperature on quantitative culture of canine urine. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 178 (10), 1077-1081
- Rowlands, M., Blackwood, L., Mas, A., Cripps, P., Crompton, C. and Burrow, R. (2011). The effect of boric acid on bacterial culture of canine and feline urine. *Journal of Small Animal Practice* 52 (10), 510-514.
- Seguin, M. A., Vaden, S. L., Altier, C., Stone, E. and Levine, J. F. (2003). Persistent urinary tract infections and reinfections in 100 dogs (1989-1999). *Journal of Veterinary Internal Medicine* 17 (5), 622-631.
- Smee, N., Loyd, K. and Grauer, G. (2013a). UTIs in Small Animal Patients: Part 1: Etiology and pathogenesis. *Journal of the American Animal Hospital Association* 49 (1), 1-7.
- Smee, N., Loyd, K. and Grauer, G. F. (2013b). UTIs in Small Animal Patients: Part 2: Diagnosis, treatment, and complications. *Journal of the American Animal Hospital Association* 49 (2), 83-94.

- Sørensen, T. M., Jensen, A. B., Damborg, P., Bjørnvad, C. R., Guardabassi, L. and Jessen, L. R. (2016). Evaluation of different sampling methods and criteria for diagnosing canine urinary tract infection by quantitative bacterial culture. *The Veterinary Journal* 216, 168–173.
- SVF, Sveriges Veterinärförbund genom Sveriges veterinärmedicinska sällskap (2009). *Sveriges veterinärförbunds antibiotikapolicy för hund- och kattsjukvård*. http://www.svf.se/Documents/S%C3%A4llskapet/Initiativ%C3%A4renden/antibiotikapolicy_2009.pdf [2017-11-27]
- LV, Läkemedelsverket (2016). *Dosering av antibiotika till hund – rekommendationer*. https://lakemedelsverket.se/upload/om-lakemedelsverket/publikationer/information-fran-lakemedelsverket/2016/Info_fran_LV_vet_suppl_2016.pdf [2017-12-26]
- Sykes, J. (2017). Update on the international guidelines on UTI (ISCAID). *WSAVA* [2017-11-27]
- Thomsen, M. K., Svane, L. C. and Poulsen, P. H. (1986). Canine urinary tract infection. Detection, prevalence and therapeutic consequences of bacteriuria. *Nordisk veterinärmedicin* 38 (6), 394–402
- Tivapasi, M. T., Hodges, J., Byrne, B. A. and Christopher, M. M. (2009). Diagnostic utility and cost-effectiveness of reflex bacterial culture for the detection of urinary tract infection in dogs with low urine specific gravity. *Veterinary Clinical Pathology* 38 (3), 337–342.
- Torres, S. M. E., Diaz, S. E., Nogueira, S. A., Jessen, C., Polzin, D. J., Gilbert, S. M. and Horne, K. L. (2005). Frequency of urinary tract infection among dogs with pruritic disorders receiving long-term glucocorticoid treatment. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 227 (2), 239–243.
- Weese, J. S., Blondeau, J. M., Boothe, D., Breitschwerdt, E. B., Guardabassi, L., Hillier, A., Lloyd, D. H., Papich, M. G., Rankin, S. C., Turnidge, J. D. and Sykes, J. E. (2011) 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, 1–9.
- Wen, S. Y., Hartmann F. A., Jooss, M. K., Viviano K. R. (2014) Prevalence and clinical outcome of subclinical bacteriuria in female dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 245 (1), 106–112
- Windahl, U. (2015). *Bacterial Infections in Dogs with Special Reference to Urinary Tract Infections, Surgical Site Infections and Methicillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius*. Diss. Sveriges lantbruksuniversitet.
- Windahl, U., Holst, B. S., Nyman, A., Gronlund, U. and Bengtsson, B. (2014). Characterisation of bacterial growth and antimicrobial susceptibility patterns in canine urinary tract infections. *Bmc Veterinary Research* 10, 10.
- Wooley, R. E. and Blue, J. L. (1976). Quantitative and bacteriological studies of urine specimens from canine and feline urinary tract infections. *Journal of Clinical Microbiology* 4 (4), 326.
- Ybarra, W. L., Sykes, J. E., Wang, Y. L., Byrne, B. A. and Westropp, J. L. (2014). Performance of a veterinary urine dipstick paddle system for diagnosis and identification of urinary tract infections in dogs and cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 244 (7), 814–819.

BILAGA 1

Tabell 3. Sammanställning av samtliga data insamlad vid denna studie

Prov	Odling på blod- och CLED-agar inom 2 timmar efter provtagning (A)		Odling på Uricult® Trio inom 2 timmar efter provtagning (B)		Uricult® Trio efter 48 timmar i värmeskåp och 48 timmar i rumstemperatur (C)		Odling på blod- och CLED-agar från urinprov som förvarats 24 timmar i rumstemperatur (D)		Odling på blod- och CLED-agar från urinprov som förvarats 24 timmar i kylskåp (E)		Odling på blod- och CLED-agar från urinprov som förvarats 24 timmar i kylskåp och 48 timmar i rumstemperatur (F)	
	CFU/ml						CFU/ml		CFU/ml		CFU/ml	
1, Cy	<i>E. coli</i>	50 000	<i>E. coli</i>	Riklig	<i>E. coli</i>	Riklig	<i>E. coli</i>	150 000 – 200 000	<i>E. coli</i>	10 000	<i>E. coli</i>	500 000 – 1 000 000
	<i>E. coli</i>	2 000	<i>E. coli</i>	Riklig	<i>E. coli</i>	Riklig	<i>E. coli</i>	10 000	<i>En. faecalis</i>	4 000	<i>E. coli</i>	60 000
	<i>En. faecalis</i>	2 000	<i>E. coli</i>	Riklig	<i>E. coli</i>	Riklig	<i>E. coli</i>	3 000	<i>Pr. mirabilis</i>	Svärmning	<i>E. coli</i>	3 000
	<i>P. mirabilis</i>	Svärmning					<i>P. mirabilis</i>	Svärmning			<i>P. mirabilis</i>	Svärmning
2, Sp	Ingen växt		Ingen växt		Ingen växt		Ingen växt		Ingen växt		Ingen växt	
3, Cy	<i>M. luteus</i>	4 000	Ingen växt		Ingen växt		Ingen växt		Ingen växt		Ingen växt	
4, Cy	<i>S. pseudintermedius</i>	500 000 – 1 000 000	<i>S. pseudintermedius</i>	Riklig	<i>S. pseudintermedius</i>	Riklig	<i>S. pseudintermedius</i>	500 000 – 1 000 000	<i>S. pseudintermedius</i>	500 000 – 1 000 000	<i>S. pseudintermedius</i>	500 000 – 1 000 000
	<i>S. pseudintermedius</i>	250 000 – 500 000	<i>S. pseudintermedius</i>	Sparsam	<i>S. pseudintermedius</i>	Sparsam	<i>S. pseudintermedius</i>	250 000 – 500 000	<i>S. pseudintermedius</i>	250 000 – 500 000	<i>S. pseudintermedius</i>	500 000 – 1 000 000
5, Sp	<i>E. coli</i>	11 000	<i>E. coli</i>	Sparsam	<i>E. coli</i>	Sparsam	<i>E. coli</i>	11 000	<i>E. coli</i>	7 000	<i>E. coli</i>	1 000
6, Cy	<i>Staphylococcus</i> spp.	500 000 – 1 000 000	<i>Staphylococcus</i> spp.	Riklig	<i>Staphylococcus</i> spp.	Riklig	<i>Staphylococcus</i> spp.	500 000 – 1 000 000	<i>Staphylococcus</i> spp.	250 000 – 500 000	<i>Staphylococcus</i> spp.	500 000 – 1 000 000
	<i>Staphylococcus</i> spp.	250 000 – 500 000	<i>Staphylococcus</i> spp.	Sparsam	<i>Staphylococcus</i> spp.	Sparsam	<i>Staphylococcus</i> spp.	250 000 – 500 000	<i>Staphylococcus</i> spp.	100 000	<i>Staphylococcus</i> spp.	250 000 – 500 000

7, Cy	Ingen växt		Ingen växt		Ingen växt		Ingen växt		Ingen växt		Ingen växt	
8, Sp	<i>E. coli</i>	120 000	<i>E. coli</i>	Riklig	<i>E. coli</i>	Riklig	<i>E. coli</i>	250 000 – 500 000	<i>E. coli</i>	40 000	<i>E. coli</i>	> 1 000 000
	<i>St. canis</i>	25 000					<i>St. canis</i>	50 000	<i>St. canis</i>	20 000	<i>E. coli</i>	10 000
9, Ka	<i>S. warneri</i>	4 000	Ingen växt		Ingen växt		Ingen växt		<i>S. warneri</i>	1 000	Ingen växt	
									<i>St. canis</i>	1 000		
10, Sp	<i>E. coli</i>	500 000 – 1 000 000	<i>E. coli</i>	Riklig	<i>E. coli</i>	Riklig	<i>E. coli</i>	1 000 000 – 1 500 000	<i>E. coli</i>	500 000 – 1 000 000	<i>E. coli</i>	> 2 000 000
11, Sp	Ingen växt		Ingen växt		Ingen växt		Ingen växt		Ingen växt		Ingen växt	
12, Cy	<i>E. coli</i>	500 000	<i>E. coli</i>	Riklig	<i>E. coli</i>	Riklig	<i>E. coli</i>	500 000 – 1 000 000	<i>E. coli</i>	300 000	<i>E. coli</i>	500 000 – 1 000 000
									<i>E. Coli</i>	60 000		
13, Sp	Ingen växt		<i>L. amnigena</i>	Sparsam	<i>L. amnigena</i>	Sparsam	<i>Ps.</i>	10 000	Ingen växt		<i>Br. dimenuta</i>	100 000
							<i>Flavescens</i>				<i>Stenotropomo</i>	100 000
							<i>nas spp.</i>	4 000			<i>nas spp.</i>	
14, Sp	<i>S. pseudintermedius</i>	2 000	<i>S. pseudintermedius</i>	Sparsam	<i>S. pseudintermedius</i>	Sparsam	<i>S. pseudintermedius</i>	30 000	<i>S. pseudintermedius</i>	150	<i>S. pseudintermedius</i>	400 000
15, Cy	Ingen växt		Ingen växt		Ingen växt		Ingen växt		Ingen växt		Ingen växt	
16, Sp	<i>E. coli</i>	500 000	<i>E. coli</i>	Riklig	<i>E. coli</i>	Riklig	<i>E. coli</i>	1 000 000 – 1 500 000	<i>E. coli</i>	500 000 – 1 000 000	<i>E. coli</i>	>4 000 000
	<i>S. pseudintermedius</i>	10 000					<i>S. pseudintermedius</i>	10 000	<i>S. pseudintermedius</i>	15 000		
17, Sp	<i>E. coli</i>	10 000	<i>E. coli</i>	Måttlig	<i>E. coli</i>	Måttlig	<i>E. coli</i>	2 800	<i>E. coli</i>	6 100	<i>E. coli</i>	100

							<i>Pa.</i> <i>agglomerans</i>	500	<i>Pa.</i> <i>agglomerans</i>	400		
18, Cy	<i>E. coli</i>	1 200 000	<i>E. coli</i>	Riklig	<i>E. coli</i>	Riklig	<i>E. coli</i>	>5 000 000	<i>E. coli</i>	1 600 000	<i>E. coli</i>	>5 000 000
19, Sp	<i>E. coli</i>	1 600 000	<i>E. coli</i>	Riklig	<i>E. coli</i>	Riklig	<i>E. coli</i>	>8 000 000	<i>E. coli</i>	2 400 000	<i>E. coli</i>	>5 000 000
	<i>E. coli</i>	5 000					<i>E. coli</i>	3 000	<i>E. coli</i>	3 000	<i>E. coli</i>	10 000
20, Sp	Ingen växt		Ingen växt		Ingen växt		Ingen växt		Ingen växt		Ingen växt	
21, Ka	Ingen växt		Ingen växt		Ingen växt		Ingen växt		Ingen växt		Ingen växt	
22, Cy	Ingen växt		Ingen växt		Ingen växt		<i>S. hominis</i>	9 000	Ingen växt		Ingen växt	
							<i>S. epidermidis</i>	1 000				
23, Cy	<i>E. coli</i>	80 000	<i>E. coli</i>	Riklig	<i>E. coli</i>	Riklig	<i>E. coli</i>	>5 000 000	<i>E. coli</i>	50 000	<i>E. coli</i>	>7 000 000
	<i>S. heamolyticus</i>	2 000							<i>E. coli</i>	1 000		
24, Sp	Ingen växt		Ingen växt		Ingen växt		Ingen växt		Ingen växt		Ingen växt	
25, Sp	<i>E. coli</i>	4 000	Ingen växt		Ingen växt		<i>E. coli</i>	300	<i>E. coli</i>	300	<i>E. coli</i>	300
26, Cy	<i>S. pseudintermedius</i>	250 000	<i>S. pseudintermedius</i>	Riklig	<i>S. pseudintermedius</i>	Riklig	<i>S. pseudintermedius</i>	150 000	<i>S. pseudintermedius</i>	100 000	<i>S. pseudintermedius</i>	300 000
	<i>S. pseudintermedius</i>	100 000	<i>S. pseudintermedius</i>	Riklig	<i>S. pseudintermedius</i>	Riklig	<i>S. pseudintermedius</i>	2 000	<i>S. pseudintermedius</i>	4 000	<i>S. pseudintermedius</i>	1 000
27, Sp	<i>E. coli</i>	5 000	<i>E. coli</i>	Sparsam	<i>E. coli</i>	Sparsam	<i>En. canintestinin</i>	22 000	<i>E. coli</i>	500	<i>S. saprophyticus</i>	300 000
							<i>E. coli</i>	1 000			<i>E. coli</i>	15 000
28, Cy	Ingen växt		Ingen växt		Ingen växt		Ingen växt		Ingen växt		Ingen växt	

29, Sp	Ingen växt	Ingen växt	Ingen växt	Ingen växt	Ingen växt	Ingen växt	Ingen växt	Ingen växt	Ingen växt	Ingen växt
30, Cy	Ingen växt	Ingen växt	Ingen växt	Ingen växt	Ingen växt	Ingen växt	Ingen växt	Ingen växt	Ingen växt	Ingen växt
31, Sp	Ingen växt	<i>S. pseudintermedius</i> Sparsam	<i>S. pseudintermedius</i> Sparsam	<i>S. pseudintermedius</i> Sparsam	<i>S. pseudintermedius</i> 8 000	<i>A. lwoffii</i> 1 000	Ingen växt	<i>S. pseudintermedius</i> 20 000		
32, Sp	<i>E. coli</i> 500 000	<i>E. coli</i> Riklig	<i>E. coli</i> Riklig	<i>E. coli</i> Riklig	<i>E. coli</i> >7 000 000	<i>E. coli</i> 3 000 000	<i>E. coli</i> 3 000 000	<i>E. coli</i> oläsbart		
33, Sp	Ingen växt	Ingen växt	Ingen växt	Ingen växt	Ingen växt	Ingen växt	Ingen växt	Ingen växt	Ingen växt	Ingen växt
34, Sp	Ingen växt	Ingen växt	Ingen växt	Ingen växt	Ingen växt	Ingen växt	Ingen växt	Ingen växt	Ingen växt	Ingen växt
35, Sp	<i>E. coli</i> 4 800 000	<i>E. coli</i> Riklig	<i>E. coli</i> Riklig	<i>E. coli</i> Riklig	<i>E. coli</i> 5 600 000	<i>E. coli</i> 5 600 000	<i>E. coli</i> 5 600 000	<i>E. coli</i> 8 000 000		
36, Cy	<i>E. coli</i> 4 800 000	<i>E. coli</i> Riklig	<i>E. coli</i> Riklig	<i>E. coli</i> Riklig	<i>E. coli</i> 6 400 000	<i>E. coli</i> 5 600 000	<i>E. coli</i> 5 600 000	<i>E. coli</i> 9 000 000		
37, Sp	<i>S. pseudintermedius</i> 300 000	<i>S. pseudintermedius</i> Riklig	<i>S. pseudintermedius</i> Riklig	<i>S. pseudintermedius</i> Riklig	<i>S. pseudintermedius</i> 700 000	<i>S. pseudintermedius</i> 350 000	<i>S. pseudintermedius</i> 350 000	<i>S. pseudintermedius</i> 4 000 000		
	<i>S. pseudintermedius</i> 100 000				<i>S. intermedius</i> 50 000	<i>S. intermedius</i> 50 000				

Information gällande samtliga insamlade prover med information om provtagningsmetod, identifierade bakteriearter och bakteriell halt på blod och CLED-agar (CFU/ml) samt bakteriell halt på Uricult® Trio (ingen växt, sparsam, måttlig, riklig växt) för samtliga odlingssteg. A = initial odling på blod- och CLED-agar, B = initial odling på Uricult® Trio, C = Odling på Uricult® Trio i 48 timmar samt förvaring i rumstemperatur i 48 timmar, D = förvaring i rumstemperatur i 24 timmar, E = förvaring i kylskåp i 24 timmar, F = förvaring i kylskåp 24 timmar och sedan i rumstemperatur i 48 timmar. Sp = spontankastat prov, Cy = prov via cystocentes, Ka = prov via kateter