

Université de Montréal

Evaluation de l'utilité clinique d'une méthode de dépistage de l'hématurie féline

par Elodie Khenifar

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire

en vue de l'obtention du grade de maîtrise ès sciences vétérinaires

option pathologie

Mars 2019

© Elodie Khenifar, 2019

## RESUME

L'hématurie correspond à un nombre augmenté d'érythrocytes dans l'urine et peut indiquer un désordre urinaire. L'importante occurrence de l'hématurie lors d'affection du bas appareil urinaire peut laisser à supposer que l'hématurie serait potentiellement un bon biomarqueur des affections du bas appareil urinaire chez le chat.

Un test non-invasif de dépistage de l'hématurie féline vient de terminer son développement. Il s'agit de granules blancs, à saupoudrer sur la litière du chat, destinés à devenir bleus rapidement au contact de l'hémoglobine.

Le but de ce mémoire est de rapporter les résultats de l'étude de ce test de dépistage et de contextualiser ces derniers en traitant du suivi de l'hématurie féline dans le cadre des affections du bas appareil urinaire.

Des études antérieures des prototypes du test de dépistage (Gara-Boivin, del Castillo et al. 2018, Khenifar, del Castillo et al. 2018, Khenifar, del Castillo et al. 2018) ont démontré un bon seuil de détection, d'environ 12[8-16] globules rouges par champ au fort grossissement microscopique x400. L'étude ici présentée a évalué le test avec 80 chats, à la fois en clinique vétérinaire et chez les propriétaires. Les performances du test ont été jugées très bonnes, avec une sensibilité de 91.5%, une spécificité de 90.9%, une valeur prédictive positive de 93.5% et une valeur prédictive négative de 88,2%.

Le produit chromogénique de dépistage a les caractéristiques requises pour une utilisation fiable dans un suivi clinique de l'hématurie féline. Des études sur une plus large population de chats ainsi que sur la gestion des affections du bas appareil urinaire sont actuellement en cours.

**Mots clés :** hématurie, chat, maladies du tractus urinaire inférieur, test de dépistage, cystite idiopathique féline, urolithiases, infection du tractus urinaire, sensibilité, spécificité, valeurs prédictives.

## **ABSTRACT**

Hematuria is defined as an increased number of erythrocytes in urine. It indicates a urinary disorder. The important occurrence of hematuria in lower urinary tract disease makes hematuria a good potential biomarker of those disorders.

A non-invasive screening test for feline hematuria has just been developed. It consists of white granules, dispersed on the cat litter, which turn blue when in contact with hemoglobin.

The goal of this memoire is to report the results of the study of this screening test and to contextualize the assessment with a review on feline hematuria monitoring in the context of lower urinary tract disorders.

Previous studies on the test (Gara-Boivin, del Castillo et al. 2018, Khenifar, del Castillo et al. 2018, Khenifar, del Castillo et al. 2018) demonstrated a good detection threshold, around 12[8-16] red blood cells per high power field upon microscopic examination. This study evaluated the test product with 80 cats, both in veterinary clinics and in the household. The test performances are considered as very good, with a 91.5% sensitivity, a 90.9% specificity, a 93.5% positive predictive value and a 88.2% negative predictive value.

The hematuria chromogenic screening test demonstrate the required characteristics for a reliable use in the follow-up of feline hematuria. Studies on a larger cat population and further studies on the management of lower urinary tract disorders are currently underway.

**Key words:** hematuria, cat, lower urinary tract disease, screening test, feline idiopathic cystitis, urolithiasis, urinary tract infection, sensitivity, specificity, predictive values.

# TABLE DES MATIÈRES

Résumé .....	ii
Abstract.....	iii
Table des matières .....	iv
Liste des tableaux .....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des sigles et des abréviations .....	xi
Avant-propos .....	1
1. Revue bibliographique.....	2
1.1 Le chat et les affections du bas appareil urinaire.....	2
1.1.1 Définition.....	2
1.1.2 Etat actuel des connaissances sur les étiologies et les prévalences des affections du bas appareil urinaire félin .....	2
1.1.3 Présentation clinique .....	4
1.3.3.1 Avec obstruction urétrale .....	4
1.3.3.2 Sans obstruction.....	4
1.1.4 Principales affections du bas appareil urinaire félin.....	4
1.1.4.1 La cystite idiopathique féline .....	4
1.1.4.2 Les urolithiases .....	5
1.1.4.3 L'infection du tractus urinaire .....	6
1.1.5 Intérêts d'une détection précoce de l'hématurie dans le cas particulier des maladies du système urinaire .....	8
1.2 L'hématurie chez le chat.....	10
1.2.1 Définition.....	10
1.2.2 Causes de l'hématurie chez le chat.....	11
1.1.2.1 Maladies du haut appareil urinaire .....	11
1.1.2.2 Bas appareil urinaire.....	11
1.1.2.3 Appareil urogénital.....	12

1.3	Approche diagnostique lors d'hématurie chez le chat .....	13
1.3.1	Les indications d'une exploration diagnostique de l'hématurie.....	13
1.3.2	Evaluation diagnostique initiale .....	14
1.3.2.1	L'anamnèse et les commémoratifs .....	14
1.3.2.2	L'examen clinique .....	15
1.3.2.3	L'analyse d'urine.....	16
1.3.3	Evaluation diagnostique secondaire .....	17
1.3.3.1	La culture urinaire .....	17
1.3.3.2	Analyses de laboratoire supplémentaires .....	18
1.3.3.3	Imagerie médicale (radiographies et échographie).....	18
1.3.3.4	Uro-endoscopie.....	19
1.3.3.5	Cytologie et histologie.....	20
1.3.3.6	Intervention chirurgicale .....	20
1.3.4	Association entre les pathologies sous-jacentes et l'apparition d'hématurie.....	21
1.3.4.1	Pathologies les plus souvent en cause lors d'hématurie.....	21
1.3.4.2	Possibilité d'utiliser l'hématurie comme biomarqueur fiable .....	21
1.4	Moyens de dépistage actuels de l'hématurie .....	22
1.4.1	Via une analyse d'urine en laboratoire d'analyse vétérinaire .....	22
1.4.1.1	Prélèvement de l'urine.....	22
1.4.1.2	Méthode d'analyse urinaire en laboratoire vétérinaire.....	25
1.4.2	Moyens actuels de détecter l'hématurie directement au domicile pour le propriétaire de chat .....	26
1.4.3	Limite actuelle des moyens de dépistage et de suivi de l'hématurie et des maladies du bas appareil urinaire .....	27
1.5	Analyse urinaire chez le chat .....	28
1.5.1	Analyses des caractères physiques urinaires .....	28

1.5.1.1	Couleur .....	29
1.5.1.2	Volume et densité.....	29
1.5.1.3	Analyses des propriétés chimiques urinaires.....	31
1.5.1.4	Analyse microscopique .....	35
1.6	Etude toxicologique du produit.....	39
1.7	Evaluation d'un test de dépistage .....	40
1.7.1	Introduction .....	40
1.7.2	Définition.....	40
1.7.3	Critères de recours au dépistage .....	40
1.7.4	Évaluation d'un test de dépistage .....	42
1.7.4.1	Généralités.....	42
1.7.4.2	Valeur intrinsèque d'un instrument de mesure.....	42
1.7.4.3	Cas qualitatif.....	42
1.7.4.4	Tests quantitatifs.....	43
1.7.4.5	Évaluation du pouvoir de repérage des malades : les valeurs de prédiction.....	44
1.7.5	Effets bénéfiques du dépistage en population .....	45
1.8	Description du produit testé.....	46
1.8.1	Caractéristiques du produit.....	46
1.8.2	Produits de la même catégorie sur le marché .....	48
1.9	Conclusion de la revue de la littérature .....	49
2.	Problématique.....	50
2.1	Problème .....	50
2.2	Objectifs.....	50
2.3	Hypothèse .....	50
3.	Etudes préliminaires et autres résultats .....	51
3.1	Etudes préliminaires sur le prototype du produit.....	51

3.1.1	Seuil de détection .....	51
3.1.2	Robustesse .....	51
3.2	Etudes préliminaires sur le produit final.....	53
3.2.1	Etude pilote.....	53
3.2.1.1	Approbation de bioéthique .....	53
3.2.1.2	Résumé de la méthodologie de l'étude pilote.....	53
3.2.1.3	Informations apportées par l'étude pilote et améliorations nécessaires .....	53
3.2.2	Publications préliminaires concernant le produit final.....	54
3.2.2.1	Seuil et robustesse .....	54
3.2.2.2	Etude multicentrique adaptative.....	56
4.	Article.....	58
4.1	Title: Reliability assessment of a novel home-screening test for feline hematuria.....	58
4.2	Abstract.....	58
4.3	Introduction.....	60
4.4	Materials and Methods.....	61
4.4.1	Bioethic approval.....	61
4.4.2	Phase 1: screening threshold determination .....	62
4.4.2.1	Red blood cells sampling.....	62
4.4.2.2	Urine sampling .....	62
4.4.2.3	Product testing.....	62
4.4.3	Phase 2: Multicentric adaptive clinical trial .....	63
4.4.3.1	Main study design.....	63
4.4.3.2	First arm, in clinic laboratory urinalysis.....	64
4.4.3.3	Second arm, in the household of cats followed for a diagnosed risk of hematuria with laboratory follow-up.....	65

4.4.3.4	Fixed hematuria threshold .....	66
4.4.4	Statistical analysis .....	67
4.5	Results.....	67
4.5.1	Phase 1: screening threshold determination .....	67
4.5.2	Interim statistical analysis .....	68
4.5.3	Study protocol amendments following the interim analysis .....	68
4.5.4	Final results .....	69
4.6	Discussion.....	71
4.7	Conclusion .....	75
4.8	References.....	76
5.	Discussion générale .....	83
6.	Conclusion.....	89
7.	Liste bibliographique.....	90



## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau I. Découvertes à l'analyse urinaire des chats présentés pour signes cliniques de pathologie du bas appareil urinaire.....	21
Tableau II. Parallèle entre les dix principes du choix d'un programme de dépistage selon l'O.M.S. et les principes de la détection rapide de la microhématurie chez le chat avec le test étudié dans le cadre de la gestion des ABAU (situation présente).....	41
Tableau III. Tableau de contingence confrontant les résultats du test à évaluer aux résultats du test de référence.....	42
Tableau IV. Exemple de produits permettant une évaluation de certains paramètres urinaires par le propriétaire, comparatif avec Blücare® .....	49

## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Composition minérale des urolithes félines.....	6
Figure 2. Urine microhématurique (A) et urines macrohématuriques (B) .....	10
Figure 3. Cystocentèse sur un chat .....	25
Figure 4. Exemple de fonction d'efficacité du récepteur ou « courbes ROC ».....	44
Figure 5. Dispersion des granules sur la litière .....	46
Figure 6. Visuel des granules : saupoudrés sur de la litière (A), souillés par de l'urine saine (B) et souillés par de l'urine hématurique (C).....	47
Figure 7. Résumé en images des instructions d'utilisation du produit.....	48
Figure 8. Présentation poster de l'étude en deux phases sur le prototype du produit	52
Figure 9. Présentation poster de l'étude sur le seuil de détection du produit final et sur la robustesse du prototype du produit.....	55
Figure 10. Présentation poster de l'étude multicentrique adaptative sur la fiabilité du produit final .....	57

## LISTE DES SIGLES ET DES ABBREVIATIONS

ABAU	affection du bas appareil urinaire
CaOx	oxalates de calcium
CFG	champ au fort grossissement microscopique
CIF	cystite idiopathique féline
GR	globules rouges
ITU	infection du tractus urinaire
M+	malade
M-	non malade
n	nombre de cas
O.M.S.	organisation mondiale de la santé
PAM	cristaux phospho-ammoniac-magnésiens
ROC	receiver operating curve, fonction d'efficacité du récepteur
RPCU	ratio protéines urinaires / créatinine urinaire
Se	sensibilité
Sp	spécificité
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
μL	microlitre
VPN	valeur prédictive négative
VPP	valeur prédictive positive

## **AVANT-PROPOS**

Le présent mémoire entre dans le cadre de l'obtention d'une maîtrise en Sciences Vétérinaires, option pathologie, de la faculté de médecine vétérinaire de Saint-Hyacinthe, Université de Montréal.

L'idée de cette étude est venue d'une volonté d'associer la rigueur du milieu académique avec le monde de l'entreprise afin de permettre des progrès dans le domaine du bien-être animal, notamment en médecine féline, où l'une des problématiques actuelles concerne le taux d'abandon et d'euthanasies de chats en refuge. L'une des premières causes d'abandon de chat étant les problèmes urinaires, notamment lors d'élimination en dehors de la litière (Beaver 2003, Carney, Sadek et al. 2014), il semble intéressant de se pencher sur le sujet.

Les chats sont en effet une espèce dont la grande popularité est en partie liée à leur réputation « d'animal propre » ; une élimination en dehors de la litière qui devient impossible à gérer peut mettre à mal la relation homme-animal et conduire à un abandon. Les chats avec ce genre de comportements finissent souvent euthanasiés en refuges (Carney, Sadek et al. 2014).

Les affections du bas appareil urinaire, en dehors de leur impact sur la santé animale, sont reconnues comme une cause importante d'« éliminations inappropriées » ou d'« éliminations non-acceptées par le propriétaire » (Neilson 2003); d'où un intérêt particulier dans les technologies pouvant directement ou indirectement aider au suivi de ces pathologies.

# **1. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **1.1 Le chat et les affections du bas appareil urinaire**

### **1.1.1 Définition**

L'appellation « affections du bas appareil urinaire » (ABAU) est donnée aux chats qui présentent un certain type de signes cliniques relativement similaires, incluant de l'hématurie, de la pollakiurie, de la strangurie, de la périurie et peuvent également présenter une obstruction urétrale (Schaer and Gaschen 2016).

### **1.1.2 Etat actuel des connaissances sur les étiologies et les prévalences des affections du bas appareil urinaire félin**

Les affections du bas appareil urinaire sont une raison courante pour un propriétaire de chat de présenter son animal au vétérinaire (Dorsch, Remer et al. 2014). D'après « the Banfield State of Pet Health » qui les regroupent sous le terme de « cystites », les ABAU représentent autour de 5% des chats de plus de 3 ans présentés en consultation vétérinaire (Klausner and Lund 2014). D'après une étude réalisée sur un peu moins de 8000 chats présentés entre novembre 2006 et octobre 2007, les consultations félines pour une pathologie liée au système urinaire (sans prendre en compte les cas venant pour des problèmes rénaux) représentaient entre 12 et 13% de toutes les consultations, classant ce motif de consultation entre le 2<sup>e</sup> et le 3<sup>e</sup> principal motif de consultation vétérinaire (Bartlett, Van Buren et al. 2010). C'est donc un important motif de consultation.

Les cas peuvent être divisés en deux groupes : les chats présentant une obstruction urétrale, et les chats qui ne sont pas obstrués mais montrent des signes cliniques. Alors que le premier groupe est principalement composé de mâles, le deuxième présente une mixité mâles/femelles (Schaer and Gaschen 2016). Un chat avec une obstruction urétrale est toujours une urgence médicale.

Dans la littérature scientifique, on retrouve un consensus sur le fait que la cystite idiopathique féline (CIF) est le diagnostic le plus courant parmi les chats avec ABAU.

Elle serait responsable des signes cliniques de 55 à 69% des ABAU (Lekcharoensuk, Osborne et al. 2001, Gerber, Boretti et al. 2005, Saevik, Trangerud et al. 2011).

La proportion des chats avec des urolithes serait entre 7 et 28% (Saevik, Trangerud et al. 2011, Kerr 2013, Dorsch, Remer et al. 2014). L'obstruction urétrale est une complication courante des ABAU, particulièrement chez les chats mâles. Toujours retrouvé dans la littérature, parmi les chats présentant une obstruction, 55% sont dus à un bouchon urétral (composé d'une matrice faite de mucoprotéines mélangée avec autres composants tels que débris, cristaux, cellules sanguines, fibrine et cellules épithéliales notamment), 28% d'entre eux n'ont pas d'élément obstruant mécaniquement l'urètre qui puisse être identifié, et 15% sont dus à des urolithes (Kruger, Osborne et al. 2009). Chez les chats avec CIF, l'urétrite et les spasmes des muscles urétraux ont été identifiés, de même que les bouchons urétraux, comme potentielles causes d'obstruction (Gerber, Boretti et al. 2005, Bartges and Polzin 2011).

Il existe une controverse à propos des chats avec des infections du tractus urinaire (ITU). Des études en provenance des Etats-Unis révèlent que moins de 3% de chats jeunes et d'âge moyen présentant des signes d'une ABAU souffrent d'ITU (Lekcharoensuk, Osborne et al. 2001, Kruger, Osborne et al. 2009). Ceci est en contradiction avec des études européennes (Suisse et Norvège), qui ont trouvé une plus grande proportion de chats touchés par l'ITU, entre 8 et 20% (Gerber, Boretti et al. 2005, Eggertsdottir, Saevik et al. 2011, Saevik, Trangerud et al. 2011). Notons que les populations étudiées étaient différentes, les études des Etats-Unis provenant d'hôpitaux de référence, les études européennes provenant à la fois de structures de référence et de première intention, il est donc possible que les vétérinaires en première ligne réussissent plus facilement à traiter les ITU et que ces dernières soient moins représentées dans des cliniques de référé.

Des différences d'incidence reliées à l'âge des patients ont été notées : la CIF est le diagnostic le plus courant chez les jeunes chats et les chats d'âge moyen (Kruger, Osborne et al. 2009), alors que chez les chats de plus de 10 ans, les ITU et les urolithiases sont les raisons les plus fréquentes lors de signes d'ABAU (Kirk 2009).

### **1.1.3 Présentation clinique**

#### **1.3.3.1 Avec obstruction urétrale**

L'obstruction urétrale apparaît typiquement chez les chats mâles entre 1 et 6 ans. Les chats obstrués font des efforts non productifs pour uriner et peuvent présenter des vocalises pendant les tentatives de miction. Les propriétaires peuvent souvent prendre ces tentatives pour de la constipation. Le léchage des parties génitales est également souvent observé. Ces chats vont généralement se cacher dans une zone isolée. En consultation, les chats amenés rapidement après l'obstruction peuvent être agressifs et non-coopératifs. Ceux présentés après une plus longue période d'obstruction vont être progressivement moins alertes. A la palpation abdominale, une vessie dure et de taille augmentée est sentie (Schaer and Gaschen 2016).

#### **1.3.3.2 Sans obstruction**

Les signes d'affection non obstructive du bas appareil urinaire sont variables mais vont généralement inclure de la strangurie, de la pollakiurie, de l'hématurie et de la dysurie. Les chats atteints peuvent présenter des vocalises pendant la miction, et peuvent uriner à des endroits inappropriés. La vessie de ces patients est généralement petite, avec une paroi épaissie. Les tentatives de collecte de l'urine par cystocentèse sont souvent infructueuses, à cause des fréquentes tentatives de miction, surtout lorsque le patient est manipulé (Schaer and Gaschen 2016).

### **1.1.4 Principales affections du bas appareil urinaire félin**

#### **1.1.4.1 La cystite idiopathique féline**

La cystite idiopathique féline (CIF) ou cystite interstitielle est la cause la plus courante d'affection chronique du bas appareil urinaire chez les chats (Osborne, Kruger et al. 1996). Le terme « interstitielle » a été retenu chez le chat à cause de la similarité de la CIF avec la cystite interstitielle humaine, qui autrefois nécessitait une évaluation de la vessie par cystoscopie pour un diagnostic final (Buffington, Chew et al. 1996).

Bien qu'elle reste un diagnostic d'exclusion, les études de ces 20 dernières années suggèrent que la CIF est le résultat d'interaction complexes entre la vessie, le système nerveux, les glandes surrénales, les pratiques d'élevage et l'environnement de vie du

chat (Chew, Buffington et al. 1996). Ce syndrome est d'autant plus compliqué que les signes cliniques peuvent être aigus ou chroniques et peuvent être associés avec plusieurs combinaisons d'anomalies dans la lumière du tractus urinaire, dans le tractus urinaire lui-même et dans d'autres organes causant des dysfonctions du système urinaire (Buffington 2011). De la comorbidité peut être notée avec le système gastrointestinal, le système respiratoire, la peau, le système nerveux central, le système cardiovasculaire et le système immunitaire (Freeman, Brown et al. 1997, Buffington 2002, Buffington 2004, Buffington, Westropp et al. 2006, Buffington, Westropp et al. 2006).

Malgré des décennies de recherche, il n'est toujours pas défini si la CIF est une seule pathologie à part entière ou s'il s'agit d'un syndrome aux causalités multiples. L'augmentation des preuves en faveur d'une implication de plusieurs systèmes, ainsi que l'évolution de la complexité dans le diagnostic des CIF ont amené un chercheur à suggérer l'utilisation du terme « syndrome de Pandore » (Buffington 2011). Un diagnostic de syndrome de Pandore s'appliquerait aux chats présentant :

- Des signes de dysfonction du bas appareil urinaire en concomitance avec des signes cliniques touchant d'autres organes,
- Une progression et régression des signes cliniques en association avec des événements stressants,
- Une réduction de la sévérité des signes cliniques suite à l'enrichissement de l'environnement.

Il est supposé qu'en élargissant le nom utilisé pour décrire les chats avec une CIF chronique, les cliniciens seront encouragés à un diagnostic et un plan thérapeutique plus complets. A long terme, cela pourrait conduire à de meilleurs résultats pour les chats atteints et leurs propriétaires (Forrester and Towell 2015).

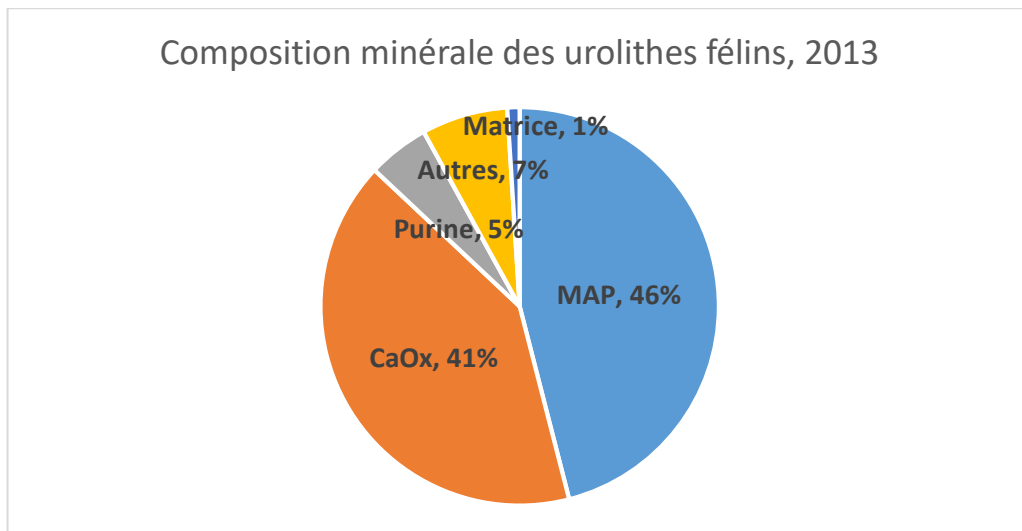
#### **1.1.4.2 Les urolithiases**

Les urolithiases sont définies comme la formations de calculs ou de pierres (c'est-à-dire d'urolithes) dans le tractus urinaire (Gunn-Moore 2003). De récentes études ont rapporté que les urolithiases ont été diagnostiquées chez 7 à 28% des chats présentés pour des signes d'ABAU (Saevik, Trangerud et al. 2011, Kerr 2013, Dorsch, Remer et al. 2014). Les urolithes les plus courants chez le chat sont les struvites (cristaux



phospho-ammoniaco-magnésiens ou PAM) et les oxalates de calcium (CaOx). Ils représentent chacun plus de 40% des urolithes (Houston and Moore 2009, Palm and Westropp 2011). Les purines représentent environ 5% des cas, et une autre substance (élément matriciel, phosphate de calcium, calculs formés de sang solidifié ou encore calculs composites et iatrogéniques) correspond aux 7% restants (Osborne, Lulich et al. 2009, Hunpravit, Lulich et al. 2014).

Figure 1. Composition minérale des urolithes félines



(données de 2013 du Minnesota Urolith Center, adapté de Ettinger, Feldman et Côté, 2017)

Les chats avec des urolithiases peuvent présenter une variété de signes cliniques liés au bas appareil urinaire. Ceci inclus, comme précédemment, la pollakiurie, la strangurie, l'hématurie, ou une combinaison de ces signes. Lorsqu'un urolithe vient se loger dans l'urètre, les signes cliniques vont correspondre à ceux d'une obstruction (Ettinger, Feldman et al. 2017).

### 1.1.4.3 L'infection du tractus urinaire

Le développement d'une infection du tractus urinaire (ITU) est multifactoriel, et dépend de l'interaction entre la virulence d'un organisme et les altérations des défenses anatomiques, environnementales et immunologiques de l'hôte (Ettinger, Feldman et al. 2017). Généralement, les pathogènes sont des bactéries uropathogènes provenant de la flore intestinale et remontent depuis la partie distale du tractus urinaire jusqu'à l'urètre proximal et la vessie (Low, Braaten et al. 1988, Johnson, Stell et al. 2001,

Johnson, Kaster et al. 2003). Une étude avec des chiens a démontré que la plupart de ceux qui possèdent des défenses urinaires non-altérées éliminaient une invasion bactérienne en 3 jours sans nécessité de traitement antibiotique (Cox and Hinman 1961). Seuls les hôtes dont les défenses étaient compromises avaient un risque de colonisation bactérienne et d'infection persistante élevé.

La définition « traditionnelle » d'ITU requiert que l'organisme invasif adhère, se multiplie et persiste dans le tractus urinaire (Osborne, Klausner et al. 1979, Lees 1996). En se basant sur de récentes observations en médecine humaine et vétérinaire, un examen microbiologique positif pour une bactériurie n'est pas équivalent à diagnostiquer une ITU. Toutes les bactériuries ne sont pas associées avec les signes cliniques d'une infection urinaire, à savoir de la douleur abdominale caudale, de la pollakiurie, de la strangurie, de l'hématurie et de la dysurie (Ettinger, Feldman et al. 2017). En médecine humaine, une bactériurie persistante sans signe clinique associé est appelée une « bactériurie asymptomatique » (Nicolle, Bradley et al. 2005). Chez les chiens et les chats, reconnaître des signes cliniques subtils d'ITU est difficile et le terme de « bactériurie subclinique » semble être plus approprié (Weese, Blondeau et al. 2011).

Très souvent en médecine humaine, le traitement des bactériuries asymptomatiques n'est pas recommandé. Premièrement, l'éradication de la bactériurie en question ne prévient pas les futures recolonisations de la vessie (Colgan, Nicolle et al. 2006) et deuxièmement, la présence de telles souches bactériennes est supposée conférer un degré de protection contre une colonisation du tractus urinaire par une bactérie plus virulente (Cai, Mazzoli et al. 2012). Des études démontrant les bénéfices d'une bactériurie en médecine vétérinaire sont manquantes, cependant, dans le peu d'études vétérinaires sur le sujet, la prévalence de ces bactériuries asymptomatiques a été rapporté entre 2,1 et 8,9% chez le chien (McGhie, Stayt et al. 2014, Wan, Hartmann et al. 2014) et entre 10 et 28,8% chez le chat (Litster, Moss et al. 2009, J., N. et al. 2013) avec *E. coli* et *Enterococcus faecalis* parmi les bactéries les plus communément identifiées (Litster, Moss et al. 2009, McGhie, Stayt et al. 2014, Wan, Hartmann et al. 2014).

### **1.1.5 Intérêts d'une détection précoce de l'hématurie dans le cas particulier des maladies du système urinaire**

Un lien a été établi entre les ABAU et la présence d'hématurie, au moins sous forme microscopique (Dorsch, Remer et al. 2014). Pour reprendre les trois principaux diagnostics finaux lors de signes d'ABAU, cette étude nous indique la présence d'hématurie (>10GR/CFG) dans 91,0% des cas lors de CIF, dans 100% des cas lors d'urolithes et dans 89,5% des cas lors d'ITU.

Les études démontrant la précocité d'apparition de l'hématurie lors de l'évolution d'une ABAU chez le chat sont encore manquantes. Nous ne pouvons actuellement que supposer que l'hématurie soit un bon biomarqueur potentiel des ABAU. Cependant, et considérant que le chat, à la fois prédateur et proie en milieu naturel, a tendance à masquer d'éventuels signes cliniques (Hellyer, Rodan et al. 2007), une alternative à la simple détection de signes cliniques par le propriétaire peut être judicieuse.

A cela vient s'ajouter que les trois pathologies précitées sont sujettes à des rechutes même en cas de traitement : globalement, 50% des chats ayant présenté un épisode d'une ABAU vont souffrir d'une récurrence (Bartges and Polzin 2011).

- La CIF est classée première, avec jusqu'à 78% de rechutes (Defauw, Van de Maele et al. 2011) ; dans cette étude a également associé un taux combiné de mortalité et d'euthanasie à ces chats sujets aux CIF de 12,5% (8/64) : 3 chats sont morts pendant une rechute d'obstruction urétrale, tandis que 5 autres chats ont été euthanasiés à cause d'une persistance des signes cliniques d'ABAU.
- Concernant les urolithes, d'après une première étude, il semblerait que la proportion de chats souffrant d'urolithiases à répétition est de 8% (Picavet, Detilleux et al. 2007) ; et d'après une autre étude, lors de la présentation du chat à la clinique pour des signes d'ABAU, la proportion de chats présentés en consultation pour un second épisode ou plus d'urolithe est de 28,6% (Dorsch, Remer et al. 2014).
- A propos des ITU, d'après la même étude, lors de la présentation du chat à la clinique pour des signes d'ABAU, la proportion de chats présentés pour un second épisode ou plus d'ITU est de 8,8% (Dorsch, Remer et al. 2014).

Les récurrences étant possibles, la mise en place d'un système de surveillance des chats avec un historique d'ABAU est à envisager, considérant qu'il s'agit d'affections communes chez les chats, possiblement dangereuses et génératrices de douleur.

Étant à la fois un bon biomarqueur potentiel des ABAU, et une source de perte de plusieurs substances endogènes (Beer and Drobotz 2016), le dépistage de l'hématurie chez le chat comme outil d'aide au diagnostic et de suivi des ABAU est ici suggéré et semble être supporté par un groupe de spécialistes en médecine féline (Scherk, Buffington et al. 2018).

## 1.2 L'hématurie chez le chat

### 1.2.1 Définition

L'hématurie est la présence d'un nombre anormal de globules rouges dans l'urine : elle peut être microscopique (invisible à l'œil nu) ou macroscopique. Il existe une hématurie « physiologique » chez les chats sains (Forrester 2004), cependant elle doit être discrète et correspondre sur un culot de centrifugation à moins de cinq hématies par champ au fort grossissement microscopique (CFG) x400 (Stockham and Scott 2008).

*Figure 2. Urine microhématurique (A) et urines macrohématuriques (B)*

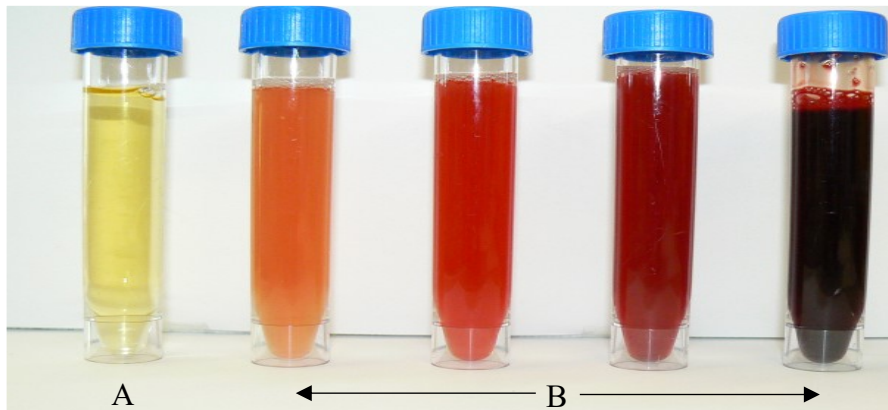


Photo de J.Ben Hamida, A.De Gorski, C.Iselin, V.Grassi, équipe de l'unité de chirurgie ambulatoire 1CL-HJ

L'hématurie microscopique est caractérisée par un faible nombre d'hématies dans l'urine et n'est visible qu'à l'examen microscopique du sédiment urinaire (Figure 2). L'hématurie est qualifiée de macroscopique lorsque les globules rouges dans l'urine sont en concentration suffisante pour être visibles à l'œil nu. L'urine peut alors apparaître rose, rouge ou marron foncé et peut contenir des caillots (Figure 2).

La détection visuelle de sang dans l'urine est possible à partir de 2500 GR/ $\mu$ L (Reppas and Foster 2016). Cependant, notons que jusqu'à 30 000 GR/ $\mu$ L, on observe uniquement une légère coloration ambrée macroscopiquement (Gara-Boivin, del Castillo et al. 2018). Sans formation médicale, il n'est pas forcément automatique de remarquer que l'urine est de couleur anormale.

## **1.2.2 Causes de l'hématurie chez le chat**

Tout désordre entraînant des dommages sur les surfaces muqueuses ou vasculaires de l'appareil urogénital peut permettre une fuite de globules rouges dans l'espace urinaire et par conséquent entraîner une hématurie.

Chez le chat, les pathologies causant cette hématurie peuvent se situer à 3 sites différents : au niveau du haut appareil urinaire (reins et uretères), du bas appareil urinaire (vessie et urètre) ou de l'appareil urogénital (utérus, vagin, vestibule, prostate et pénis).

### **1.1.2.1 Maladies du haut appareil urinaire**

Il s'agit de désordres touchant les reins et/ou les uretères. On retrouve (Forrester 2004) :

- Les lithiases urinaires
- Les phénomènes néoplasiques (notamment carcinome, hémangiosarcome, hémangiome, sarcome)
- Les intoxications (par exemple, la nécrose tubulaire aigue lors d'intoxication à l'éthylène glycol)
- Les troubles de la coagulation (coagulation intravasculaire disséminée, déficience en facteur de la coagulation [hémophilie], antagonistes de la vitamine K [coumarine et brodifacoum], thrombocytopenie, maladie de Von Willebrand etc.)
- Les maladies glomérulaires (ou glomérulopathies, ex : glomérulonéphrite)
- L'hématurie rénale idiopathique
- Les phénomènes infectieux (leptospirose, maladie de Lyme, pyélonéphrite etc.)
- La maladie rénale polykystique (polykystose rénale, présentant des kystes au niveau de reins)
- Les anomalies vasculaires (infarcissement rénal, télangiectasie)
- Un traumatisme (impact, blessure pénétrante, biopsie rénale)

### **1.1.2.2 Bas appareil urinaire**

Il s'agit de désordres touchant la vessie et/ou l'urètre. On retrouve (Forrester 2004, Reine and Langston 2005) :

- Les phénomènes inflammatoires (notamment cystite interstitielle féline, urétrite)

- Les lithiases urinaires
- Les phénomènes infectieux (ou infection du tractus urinaire)
- Les troubles de la coagulation
- Les phénomènes néoplasiques (rhabdomyosarcome, fibrome)
- Les intoxications ou les origines médicamenteuses (par exemple, la cystite hémorragique stérile aux cyclophosphamides)
- La cystite polypoïde
- Un traumatisme (un choc, une procédure diagnostique telle que cathétérisme urétral, cystocentèse, cystoscopie, retro-hydropropulsion)

### **1.1.2.3 Appareil urogénital**

Il s'agit de désordres touchant l'utérus, le vagin, le vestibule, la prostate ou le pénis.

On retrouve (Forrester 2004) :

- Les phénomènes néoplasiques
- Les maladie prostatique (notamment hypertrophie bénigne de la prostate, néoplasie, prostatite)
- Une subinvolution placentaire
- Les phénomènes infectieux (par exemple, endométrite, pyomètre, vaginite)

## **1.3 Approche diagnostique lors d'hématurie chez le chat**

### **1.3.1 Les indications d'une exploration diagnostique de l'hématurie**

Une hématurie indique la présence d'une maladie sous-jacente de l'appareil urogénital et justifie une évaluation diagnostique. La présence d'une hématurie macroscopique, d'une hématurie microscopique (persistante ou récurrente) ou d'un seul épisode d'hématurie associé à d'autres symptômes (tels qu'une strangurie ou une pollakiurie) est une indication suffisante pour des tests diagnostiques. En cas de cystocentèse, lorsque l'on retrouve une légère hématurie (à savoir, entre 5 et 15 globules rouges par champ au fort grossissement microscopique x400) et qu'il n'y a aucune autre anomalie, on attribue généralement cette hématurie à une origine iatrogénique. La réévaluation du patient est ensuite à envisager via une méthode de collecte non invasive (Forrester 2004).

Au début des années 2000, un groupe d'experts de l'« American Urological Association » a établi un consensus dans l'évaluation de la microhématurie asymptomatique chez l'adulte (Grossfeld, Litwin et al. 2001, Grossfeld, Wolf et al. 2001). La microhématurie a été définie chez l'humain comme au moins trois globules rouges par champ à l'observation microscopique au fort grossissement du sédiment urinaire d'au moins deux échantillons urinaires sur trois collectés correctement (à savoir sur des urines fraîchement émises, récoltées proprement et au milieu de la miction).

Les patients humains présentant de la microhématurie ainsi que des cylindres, des globules rouges urinaires dysmorphiques, de la protéinurie significative ou une azotémie sont alors des candidats pour une exploration rénale, voire pour une exploration complète de l'appareil urinaire, incluant un examen clinique, des analyses de laboratoire, une cytologie urinaire, des examens d'imagerie et une cystoscopie (Grossfeld, Litwin et al. 2001).

Comme il arrive que des patients avec une évaluation initiale de microhématurie asymptomatique développent par la suite une maladie du système urinaire, un suivi est recommandé (Grossfeld, Wolf et al. 2001). Par exemple, l'apparition d'hématurie peut



précéder de plusieurs années le diagnostic du cancer de la vessie chez l'être humain (Hiatt and Ordonez 1994).

Les études évaluant l'utilité du diagnostic d'une hématurie subclinique chez les carnivores domestiques font encore défaut à l'heure actuelle. Une évaluation des chats et chiens avec une hématurie microscopique persistante serait pourtant à considérer de façon raisonnable, même en l'absence d'autres symptômes de maladie urogénitale. Et cette évaluation serait même encore plus appropriée pour des patients prédisposés à des maladies graves, telles que des tumeurs malignes (Forrester 2004).

Bien que ce sujet reste à être étudié, il semble possible que le diagnostic et l'exploration d'une hématurie microscopique puisse conduire à un diagnostic plus précoce et à la mise en place d'un traitement ayant ainsi plus de résultats chez les carnivores domestiques avec une grave atteinte du tractus urinaire.

### **1.3.2 Evaluation diagnostique initiale**

L'hématurie indique la présence d'une maladie urogénitale chez les chats. Une hématurie persistante (macroscopique ou microscopique) devrait systématiquement être évaluée afin de déterminer la source du saignement et la cause sous-jacente (Kirk 2009, Ettinger, Feldman et al. 2017).

L'anamnèse et les commémoratifs, ainsi que l'examen clinique aident généralement à cibler le haut ou le bas appareil urinaire (ou encore l'appareil génital). Des examens complémentaires, incluant des analyses de laboratoire (par exemple, analyse d'urine, culture urinaire), de l'imagerie médicale (par exemple, radiographie abdominale, échographie) et le prélèvement d'échantillons tissulaires pour des analyses cytologiques ou histologiques peuvent être nécessaires afin d'établir un diagnostic. Dans les cas où de telles explorations ne révèlent toujours par la cause de l'hématurie, une céliotomie exploratoire est à envisager.

#### **1.3.2.1 L'anamnèse et les commémoratifs**

La présence de signes concomitants peut également aider à localiser la source de l'hématurie. La pollakiurie, la dysurie ou la strangurie sont autant de signes qui orientent vers un désordre du bas appareil urinaire (Buffington, Chew et al. 1997).

Notons tout de même que, dans de rares cas, ces signes peuvent être observés chez des patients avec une sévère hématurie rénale et qui ont des caillots sanguins dans la vessie ou l'urètre (Hawthorne, deHaan et al. 1998).

Chez le chat, il n'est pas toujours facile de récolter des informations auprès des propriétaires concernant la miction. Lorsque c'est possible, ces informations peuvent se révéler très utiles.

Dans le cas d'une hématurie macroscopique, le moment d'apparition de la coloration pendant la miction aide également à la localisation de la cause (Grauer 2008, Ettinger, Feldman et al. 2017). L'hématurie initiale, c'est-à-dire la présence de sang dans la première fraction d'émission d'urine a tendance à être associée à des pathologies de l'urètre ou de l'appareil génital. L'hématurie terminale (à la fin de la miction) suggère quant à elle une lésion focale sur la partie ventrale de la vessie (comme par exemple dans le cas de lithiases ou de polypes). Dans ces cas-là, les globules rouges restent dans cette aire de la vessie et sont émis à la fin de la miction. De l'hématurie terminale peut également être observée en cas de pathologie rénale intermittente. L'hématurie totale (apparaissant tout au long de la miction) peut être associée avec des troubles de la coagulation, avec une pathologie du haut appareil urinaire ou une lésion généralement diffuse de la vessie (Osborne, Stevens et al. 1999).

### **1.3.2.2 L'examen clinique**

Un examen clinique approfondi est indiqué chez les chats hématuriques, avec une attention particulière à porter aux éventuels signes de troubles de la coagulation (anémie, épistaxis, méléna, saignement prolongé sur des sites de ponction par exemple) et à la palpation des organes du système urogénital. Les patients avec une anémie secondaire à une hématurie sévère peuvent présenter des muqueuses pâles, avec un temps de recoloration capillaire augmenté. Les désordres hémostatiques primaires (ex : thrombocytopenie, maladie de Von Willebrand) peuvent être caractérisés par des pétéchies ou des ecchymoses hémorragiques, alors que les déficiences en facteurs de coagulation (ex : antagonistes de la vitamine K, hémophilie) peuvent en plus engendrer des hématomes et de l'hémarthrose (Ettinger and Feldman 2000). La palpation abdominale se focalisera sur les reins, la vessie, les nœuds

lymphatiques iliaques et la prostate. Un examen rectal apportera des informations sur l'uretère, la partie caudale de la vessie et la prostate.

Enfin, si le clinicien peut observer le chat uriner (par exemple sur une vidéo prise par les propriétaires), cela peut aider à identifier ou à confirmer la présence de dysurie, strangurie, de pollakiurie ainsi qu'à déterminer le moment d'apparition de l'hématurie lors de la miction. Cela peut également permettre de récolter un échantillon d'urine (au milieu de la miction), ce qui est indiqué chez tous les patients hématuriques (Forrester 2004).

### **1.3.2.3 L'analyse d'urine**

L'analyse de l'urine est tout d'abord indispensable à la confirmation d'une hématurie, mais également à son interprétation.

Une analyse urinaire sur une miction spontanée devrait si possible être effectuée initialement, afin d'éviter la création d'une hématurie iatrogène associée à la cystocentèse. Dans le cas où l'hématurie a dû être initialement identifiée sur une cystocentèse, un autre échantillon d'urine devra être collecté par miction au moins 24 heures après. Si une hématurie est présente dans un échantillon de miction spontanée mais pas par cystocentèse, des pathologies du système génital (vagin, urètre distale ou pénis) peuvent être suspectées. Trouver cette hématurie via les deux types d'échantillonnage peut indiquer un saignement rénal, urétéral, vésical, urétral proximal ou prostatique. L'analyse urinaire doit être réalisée dans son intégralité, incluant l'aspect visuel, les analyses biochimiques (densité urinaire et bandelette) et l'observation au microscope du sédiment urinaire. Initialement, la couleur et la transparence de l'urine sont évaluées. Les cas avec une hématurie macroscopique ont une coloration urinaire visible à l'œil nu, de teinte souvent rose, rouge, brun-rougeâtre ou marron. Les analyses à l'aide d'une bandelette urinaire révèlent généralement une réaction positive aux plages « sang » et « protéines » (Forrester 2004).

Notons que la présence de myoglobine, d'hémoglobine ou de globules rouges peut entraîner une réaction positive de la plage « sang » à la bandelette (Stockham and Scott 2008). La myoglobinurie est rare chez les chats, mais peut apparaître en cas de sévère lésion musculaire, notamment en cas de traumatisme, de nécrose ou d'ischémie.

L'hémoglobinurie peut provenir soit d'une lyse des globules rouges présents dans l'urine (ce qui peut se produire par exemple dans une urine diluée ou alcaline), soit d'une hémolyse intravasculaire assez massive pour saturer les capacités de fixation de l'haptoglobine. Contrairement à l'hémoglobinurie secondaire à une lyse des globules rouges urinaires, l'hémolyse intravasculaire est associée à une coloration rose du plasma.

L'examen du culot urinaire suite à la centrifugation requiert un temps additionnel mais est nécessaire pour confirmer la présence d'hématurie et peut apporter des informations complémentaires utiles. Excepté en cas de lyse locale due à la dilution (lorsque la densité urinaire est inférieure à 1,008) ou en cas d'alcalinisation de l'urine, les globules rouges peuvent être identifiés sur un culot urinaire de patients hématuriques (Stockham and Scott 2008).

Selon la cause initiale, d'autres anomalies peuvent être mises en évidence, notamment de la pyurie (en cas d'inflammation du tractus urinaire, d'infection ou de phénomène néoplasique), des cellules épithéliales dysplasiques ou malignes (également en cas d'inflammation du tractus urinaire, d'infection ou de phénomène néoplasique), des cylindres (en cas de pathologie rénale ou de blessure), des bactéries (en cas d'infection du tractus urinaire) ou encore des cristaux (en cas de possibles calculs urinaires).

Des cylindres composés de globules rouges sont rarement retrouvés dans l'urine ; cependant leur présence est signe de saignement rénal d'origine tubulaire, et est très probablement pathognomonique d'hémorragie glomérulaire chez les chiens et chats (Osborne, Stevens et al. 1999).

### **1.3.3 Evaluation diagnostique secondaire**

Lorsque des doutes persistent malgré l'évaluation diagnostique primaire quant à la source du saignement, une évaluation diagnostique secondaire est recommandée.

#### **1.3.3.1 La culture urinaire**

Il est indiqué de réaliser une culture urinaire en cas d'hématurie chez les chats et les chiens. L'infection du tractus urinaire (ITU) peut en effet engendrer de l'hématurie, et

les autres désordres du système urinaire causant de l'hématurie (tels que des calculs ou des phénomènes néoplasiques par exemple) peuvent à leur tour altérer les mécanismes de défense de l'hôte, prédisposant ainsi l'hôte à une ITU (Forrester, Troy et al. 1999, Seguin, Vaden et al. 2003).

### **1.3.3.2 Analyses de laboratoire supplémentaires**

En fonction de la cause primaire suspectée de l'hématurie, d'autres tests de laboratoire peuvent être indiqués. Un hémogramme peut révéler une anémie sévère chez certains patients hématuriques (Littman, Niebauer et al. 1990). D'après l'expérience des auteurs de cette étude, les anémies sévères et mettant en jeu le pronostic vital de l'animal sont plus souvent retrouvées chez les patients avec des hématuries rénales idiopathiques, des troubles de la coagulation (par exemple lors de thrombocytopénie sévère) et des néoplasies rénales (par exemple en cas d'hémangiosarcome).

Une biochimie est indiquée afin d'évaluer la fonction rénale et de détecter des signes de maladie sous-jacente.

Si aucune cause possible d'hématurie n'a été mise en évidence après l'évaluation initiale, ou s'il existe d'autres signes de saignements (tels que des pétéchies ou de l'épistaxis), un test de coagulation est indiqué. Si un défaut d'hémostase primaire est suspecté, un comptage plaquettaire est recommandé initialement. Une hémorragie associée avec une thrombocytopénie n'arrive généralement pas sans que le compte plaquettaire ne soit inférieur à 50 000 par microlitre (Prater and Tvedten 2004). Si le comptage plaquettaire est normal, une évaluation du temps de saignement peut être effectuée pour évaluer la fonction plaquettaire et rechercher une maladie de von Willebrand. Si une déficience en facteurs de la coagulation ou une coagulation intravasculaire disséminée sont suspectées, des tests de coagulations sont à envisager (Forrester 2004).

### **1.3.3.3 Imagerie médicale (radiographies et échographie)**

Des clichés radiographiques abdominaux et une échographie sont utiles dans l'identification et la caractérisation des lésions du tractus urinaire causant de l'hématurie (Leveille 1998, Thrall 2013). Les signes de maladie rénale (néphromégalie, masses rénales, calculs rénaux, infarctissement), d'anomalie

prostatique (hypertrophie de la prostate), de lithiase et de signes de métastases de tumeurs de l'appareil urogénital (augmentation de taille de nœuds lymphatiques iliaques, lésions osseuses prolifératives vertébrales ou pelviennes) peuvent être repérés sur une radiographie abdominale. L'échographie abdominale peut permettre de repérer des modifications de la conformation rénale ou des anomalies au niveau de la vessie.

En cas d'échec dans le diagnostic via les radiographies et l'échographie abdominales, une procédure de radiographie de contraste peut être indiquée. Si des signes de pathologie du bas appareil urinaire sont présent, une cystographie à double contraste et une urétrographie à contraste positif sont à envisager (Thrall 2013). L'imagerie médicale de patients avec des atteintes néoplasiques du bas appareil urinaire révèlent généralement une masse occupant de l'espace dans la vessie ou l'urètre.

D'autres anomalies tels que les urolithes, les cystites polyplœides et les caillots sanguins peuvent être identifiés par des procédures de radiographies de contraste. Si une maladie rénale ou urétérale est suspectée, une urographie intraveineuse peut révéler des indications sur une pyélonéphrite, une hydronéphrose, une néoplasie rénale ou des urolithes (Forrester 2004).

#### **1.3.3.4 Uro-endoscopie**

En cas d'échec de techniques diagnostiques moins invasives, une uréthrocystoscopie est indiquée dans l'examen des cas hématuriques, particulièrement pour les cas présentant des signes de maladies du bas appareil urinaire (Chew, Buffington et al. 1996, McCarthy 1996, Cannizzo, McLoughlin et al. 2001). L'uréthrocystoscopie permet de visualiser l'orifice urétral et les muqueuses urétérales et vésicales. Elle permet également de réaliser des biopsies, d'extraire des calculs ainsi que la collecte d'urine depuis chaque uretère individuellement dans le but d'un diagnostic d'hématurie rénale ou de pyélonéphrite.

L'uréthrocystoscopie peut être réalisée avec un cystoscope rigide ou flexible chez les femelles, mais pour des raisons anatomiques, seul un endoscope flexible peut être utilisé chez les mâles (Chew, Buffington et al. 1996, Cannizzo, McLoughlin et al. 2001).

### **1.3.3.5 Cytologie et histologie**

Un prélèvement tissulaire en vue d'examen microscopique peut être nécessaire pour confirmer la cause sous-jacente à une hématurie dans certains cas, particulièrement dans les phénomènes tumoraux. Des échantillons pour des examens cytologiques sont faciles à prendre, et les résultats sont parfois suffisants pour poser un diagnostic, par exemple dans le cas où des critères cytologiques de malignité existent (Meinkoth and Cowell 2002, Borjesson 2003). Cependant, une inflammation concomitante (telle qu'une cystite) peut très bien entraîner des changements mimant un phénomène néoplasique, par exemple des cellules transitionnelles dysplasiques (Meinkoth and Cowell 2002).

Les résultats d'une cytologie sont toujours à interpréter avec prudence et en tenant compte des autres découvertes diagnostiques. L'histologie est préférable quand les résultats de la cytologie sont douteux ou lorsqu'un meilleur niveau de précision pourrait permettre une adaptation du traitement ou l'établissement d'un pronostic plus précis, par exemple pour les pronostics reposant sur le grade d'une tumeur (Valli, Norris et al. 1995).

Les échantillons de tissus pour l'analyse cytologique et histologique peuvent être collectés via plusieurs méthodes, incluant l'aspiration percutanée, la biopsie assistée par aspiration, l'uro-endoscopie, et souvent la biopsie ouverte pendant une chirurgie (Chew, Buffington et al. 1996, McCarthy 1996, Cannizzo, McLoughlin et al. 2001, Kirk 2009).

### **1.3.3.6 Intervention chirurgicale**

Il arrive qu'il faille recourir à une céliotomie exploratoire lorsque les autres évaluations diagnostiques ont échoué ou lorsque le traitement de la cause sous-jacente se révèle être de nature chirurgicale (par exemple dans le cas d'une tumeur rénale). Les troubles de la coagulation sont à exclure en premier avant toute chirurgie. De même qu'avant d'envisager une néphrectomie, une mesure du débit de filtration glomérulaire de l'autre rein doit être réalisée, habituellement par scintigraphie (Forrester 2004).

## 1.3.4 Association entre les pathologies sous-jacentes et l'apparition d'hématurie

### 1.3.4.1 Pathologies les plus souvent en cause lors d'hématurie

Les origines de l'hématurie sont nombreuses. Essentiellement, la mention de l'hématurie chez le chat revient très souvent dans le cadre des pathologies du bas appareil urinaire. Elle peut être associée ou non avec de la strangurie (douleur à la miction), de la périurie (mictions à des endroits inopportuns, hors de la litière), de la dysurie (difficulté lors de la miction) et de la pollakiurie (petites mictions fréquentes) ; qui sont une série d'autres signes cliniques indicateurs de ce qui est communément appelé les « affections du bas appareil urinaire » (ABAU) du chat (Cameron, Casey et al. 2004, Ettinger, Feldman et al. 2017).

### 1.3.4.2 Possibilité d'utiliser l'hématurie comme biomarqueur fiable

Inversement, lorsque ces pathologies du bas appareil urinaire se manifestent, l'hématurie, au moins sous forme de micro-hématurie, est quasi-systématiquement présente en parallèle. En effet, une étude rétrospective a présenté qu'il y avait présence de plus de 10 globules rouges à l'observation microscopique x400 de 91% (260/302) des chats présentés pour signes cliniques compatibles avec une pathologie du bas appareil urinaire (Dorsch, Remer et al. 2014).

Et, plus précisément, voici les détails de leur étude : le Tableau I présente le nombre de cas présentant plus de 10 GR/CFG x400 à l'analyse urinaire selon la pathologie diagnostiquée.

*Tableau I. Découvertes à l'analyse urinaire des chats présentés pour signes cliniques de pathologie du bas appareil urinaire*

	Total	CIF	ITU	Bouchon urétral	Urolithes	Néoplasie
	n=302	n=166	n=57	n=31	n=21	n=11
>10GR/CFG	260 90,9%	151 91,0%	51 89,5%	28 90,3%	21 100%	9 81.8%

(CIF= cystite idiopathique féline, ITU= infection du tractus urinaire ;  
adapté de Dorsch, Remer et al. 2014)



## **1.4 Moyens de dépistage actuels de l'hématurie**

### **1.4.1 Via une analyse d'urine en laboratoire d'analyse vétérinaire**

Une analyse d'urine complète peut apporter des informations importantes concernant à la fois des désordres urinaires et des pathologies non-relées au système urinaire (Ettinger, Feldman et al. 2017).

Pour une bonne analyse et une interprétation adéquate, la méthode de collection de l'urine – miction spontanée, sondage urétral ou cystocentèse – doit être choisie avec soin. La docilité du patient, le risque de traumatisme de la vessie et le degré d'expertise du manipulateur comptent parmi les principaux facteurs décisionnels qui vont influencer le choix (Ettinger, Feldman et al. 2017). Chacune des 3 méthodes décrites possède ses avantages et inconvénients.

#### **1.4.1.1 Prélèvement de l'urine**

Afin de réaliser une analyse d'urine en laboratoire d'analyse vétérinaire, que ce soit en laboratoire d'analyse spécialisé ou directement au laboratoire de la clinique / du cabinet vétérinaire, il est nécessaire d'effectuer un prélèvement. On distingue trois techniques de prélèvement de l'urine (Maurey 2005, Chew, DiBartola et al. 2011).

##### **Miction spontanée**

Elle correspond à une récolte de l'urine suite à une miction spontanée du chat. Cette méthode a l'avantage d'être non-invasive. L'inconvénient majeur de ce mode de prélèvement est le contact de l'urine avec l'appareil génital externe et la peau, à l'origine de débris cellulaires et de contaminations bactériennes dans l'urine émise. Cette méthode de prélèvement n'est donc pas recommandée pour les cultures bactériologiques (Maurey 2005, Reine and Langston 2005).

En revanche, l'analyse physicochimique sur ces urines est couramment admise. Comme la partie initiale de la miction spontanée va contenir des cellules, des bactéries et des débris provenant de l'urètre et de la vulve ou du prépuce, et en cela ne sera pas un échantillon représentatif de la composition urinaire, il semble préférable, lorsque c'est possible, de privilégier les urines de milieu de miction (Maurey 2005, Reine and Langston 2005).

Le contenant de l'urine doit être propre et être dépourvu de traces de détergents afin d'éviter toute interférence avec l'analyse biochimique (Reine and Langston 2005).

Chez le chat, obtenir un échantillon d'urine du milieu de la miction spontanée peut être une tâche ardue. A la place, un échantillonnage considéré comme correct d'une miction complète peut se faire par exemple au moyen d'une litière composée d'un matériau non-absorbant (Reine and Langston 2005) :

- Litière de bille non-absorbante (Nosorb® par Catco, Inc. Cape Coral, FL, USA ; Katkor® par Rein Vet Product, Pays-Bas, etc.),
- Sable de litière non-absorbant (Kit4Cat® par Coastline Global, Palo Alto, California, USA etc.),
- Autre composé non-absorbant (matériel d'emballage en plastique, maïs pour pop-corn non éclaté),
- Film de plastique placé au-dessus de la litière pour collecter l'urine des chats avec des protège-griffe ou dégriffés.

La composition de l'urine pour l'analyse physicochimique semble être conservée si le prélèvement est effectué dans les 2h (Delpont and Fourie 2005). Notons que l'étude pilote de ce mémoire montre que certains chats peuvent rapidement présenter une aversion à la litière de billes. Une aversion à la litière pouvant entraîner de la périurie (Neilson 2003), de telles analyses de routine avec un chat présentant une aversion à ce type de litière sont difficilement envisageables.

Notons également dans cette section une méthode de prélèvement similaire, via les voies naturelles par pression manuelle sur la vessie, appelée « taxis ». La pression sur la vessie est censée induire la miction. Lorsque le chat est anesthésié, un prélèvement est simple à obtenir via cette méthode. Sur un animal vigile en revanche, cette technique réussit rarement et peut même induire un reflux vésiculo-urétéral. Si l'urine est contaminée, on augmente ainsi le risque d'une pyélonéphrite ascendante (Reine and Langston 2005). L'urine cheminant via les voies naturelles, cette méthode possède les mêmes inconvénients que la récolte par miction spontanée : des potentiels contaminants externes rendent cette technique proscrite pour un examen bactériologique. A cela s'ajoutent de faibles risques iatrogéniques d'hématurie et de

rupture de la vessie, particulièrement si la paroi est friable à cause d'une pathologie préexistante (Ettinger, Feldman et al. 2017).

### **Sondage urétral**

Généralement, le sondage urinaire requiert une contention pharmacologique chez les chats. Un chat mâle devrait être placé en décubitus dorsal, avec ses pattes arrière ramenées vers l'avant. Le pénis est extériorisé du prépuce. Comme l'urètre pénien est physiologiquement dirigé vers le bas, le pénis devrait être tiré caudalement et dorsalement afin d'aligner l'urètre parallèlement à la colonne vertébrale, lissant la courbe naturelle. Un cathéter de taille 3,5 à 5 Fr peut alors être placé dans la vessie (Reine and Langston 2005).

Quelques bonnes pratiques d'hygiène sont à respecter (Zacharias 2008) :

- Tonte et nettoyage de la région urogénitale, de façon similaire à une préparation chirurgicale, avant la mise en place du cathéter, en veillant bien à extérioriser le pénis pendant le nettoyage,
- Gants stériles à utiliser par le manipulateur,
- Cathéter, lubrifiant et fluides d'irrigation stériles,
- Asepsie à maintenir jusqu'à la fin de la mise en place de la procédure de collecte des urines ; système de préférence clos afin de garantir la continuité de la stérilité (Lees 1996, Côté 2007).

Le sondage n'est pas effectué en routine car il requiert une sédation du chat, sauf si son usage est également à des fins thérapeutiques. Par exemple, lors des obstructions urétrales, cette méthode a l'avantage d'être à la fois diagnostique et thérapeutique (Ettinger, Feldman et al. 2017).

Ce geste permet également une évaluation de la lumière urétrale. Cependant, l'urine ainsi prélevée est souvent modifiée par les microtraumatismes induits par la sonde (sang, cellules).

Il ne faut pas oublier que l'altération de l'urothélium associée à un non-respect des règles d'asepsie sont une cause fréquente d'infection du tractus urinaire (Maurey 2005).

## Cystocentèse

Cette technique permet un recueil d'urine non contaminée et est idéale pour des cultures urinaires (Ettinger, Feldman et al. 2017). Elle peut également apporter une valence thérapeutique, notamment pour une décompression des voies urinaires lors d'obstruction (Ettinger, Feldman et al. 2017).

Il s'agit de prélever directement l'urine dans la vessie au moyen d'une ponction transabdominale à l'aiguille fine (Figure 3). Réalisé sur un animal vigile, ce geste n'est pas toujours facile à effectuer avec des patients non-coopératifs. Un guidage échographique peut faciliter la localisation de la vessie (notamment chez les animaux gras, ou avec une vessie de petite taille).

Il est préférable d'éviter cette technique de prélèvement sur des vessies très distendues ou sur les vessies avec une inflammation préexistante, et cette technique peut induire une hématurie microscopique (Maurey 2005, Ettinger, Feldman et al. 2017).

*Figure 3. Cystocentèse sur un chat*



(Il est nécessaire de tondre et de désinfecter la région abdominale en regard du site de ponction. Les aiguilles de faible diamètre sont à privilégier.

Photo de Drs. C. Bille, A.-S. Meunier, A. Gautherot)

### 1.4.1.2 Méthode d'analyse urinaire en laboratoire vétérinaire

Il s'agit ici d'un résumé non-exhaustif de la méthode d'analyse urinaire pratiquée au laboratoire d'analyse vétérinaire de la faculté de médecine vétérinaire de Saint-Hyacinthe, Université de Montréal. La méthode d'analyse ici utilisée est compatible

avec les recommandations retrouvées dans la littérature (Reppas and Foster 2016, Reppas and Foster 2016, Piech and Wycislo 2019).

**Matériel nécessaire :**

- Centrifugeuse
- Réfractomètre
- Bandelette urinaire
- Colorant pour culot urinaire
- Microscope

**Examen urologique :**

- Aspect macroscopique de l'urine (couleur, turbidité) ;
- Centrifugation 5 minutes, à 3000 tours/minute de 5 mL d'urine si possible ;
- Séparation du culot de centrifugation et du surnageant :
  - *Sur le surnageant* : densité urinaire au réfractomètre, bandelette urinaire ;
  - *Sur le culot* : coloration puis lecture au microscope entre lame et lamelle. Pour les érythrocytes : lecture de l'échantillon à la puissance x400 sur dix champs.

Une méthode d'examen urologique sera décrite plus en détail ci-dessous.

#### **1.4.2 Moyens actuels de détecter l'hématurie directement au domicile pour le propriétaire de chat**

Actuellement, hormis le test étudié, il ne semble pas exister de test facile permettant au propriétaire la détection de la microhématurie féline à la maison. Le dépistage de l'hématurie passe par la récolte puis l'analyse de l'urine du chat.

Un produit avait été sur le marché il y a plusieurs années : Hemalert®, de Ralston Purina Company. Il s'agissait de petites bandelettes à placer sur la litière, présentant une réaction chromogénique à l'hématurie. Ce produit a été retiré du marché pour des raisons non expliquées au public.

### **1.4.3 Limite actuelle des moyens de dépistage et de suivi de l'hématurie et des maladies du bas appareil urinaire**

Actuellement, les seuls moyens de pouvoir détecter l'hématurie semblent donc imposer de passer par une récolte d'urine puis une analyse. Comme établi précédemment, le problème se trouve principalement dans la récolte de l'urine de chat, chose qui n'est à l'heure actuelle pas facile.

Parallèlement à cela, les ABAU étant souvent récurrentes (Bartges and Polzin 2011), il est intéressant de suivre un chat sujet à ces désordres urinaires. Or, comme mentionné plus haut, les signes cliniques d'ABAU ne sont pas toujours facilement repérés par les propriétaires et un outil permettant de signaler les ABAU de façon précoce serait intéressant.

L'hématurie microscopique étant ici considérée comme un bon biomarqueur potentiel des ABAU, un test de dépistage de la microhématurie peut être considéré utile à ce stade de nos connaissances.

## **1.5 Analyse urinaire chez le chat**

Un test de dépistage de l'hématurie ne donne de l'information que sur un seul paramètre, et il ne peut remplacer une analyse d'urine complète, qui est notamment indispensable aux diagnostics d'ABAU.

Ci-après se trouve une proposition de technique d'analyse urinaire, afin de souligner l'importance de cette dernière et les précieuses informations qu'elle peut apporter. Malheureusement, elle est parfois négligée en pratique générale (Piech and Wycislo 2019). Lors de l'étude clinique, il est apparu que les structures vétérinaires étaient très intéressées par des rappels sur l'analyse d'urine ; d'où cette section.

La plupart des cabinets vétérinaires peuvent et devraient faire des analyses d'urine en interne afin d'améliorer la qualité des soins ; permettant par la même occasion d'augmenter leur rentabilité économique (Callens and Bartges 2015). Ces analyses ne nécessitent en termes de fournitures qu'un équipement de laboratoire de base tel qu'une centrifugeuse, un réfractomètre, un microscope, voire en option un lecteur automatique de bandelette ; ainsi que quelques consommables (des tubes à essai, des pipettes, des tubes à centrifugation coniques, des bandelettes, des lames et des lamelles de verre, ainsi que du colorant pour le sédiment).

Ces analyses peuvent être rapidement réalisées par le personnel technique de la clinique, à condition qu'il soit correctement formé ; rendant ainsi cette procédure peu coûteuse et accessible. De plus, il est souvent préférable de privilégier les tests en interne, permettant ainsi un gain de temps et une meilleure fiabilité des résultats ; le délai écoulé entre un prélèvement et une analyse pouvant être source d'erreur (Stockham and Scott 2008, Callens and Bartges 2015). De plus, il est ainsi plus facile de corrélérer les résultats de l'analyse avec le reste du tableau diagnostique du patient.

Les techniques de prélèvements ont été abordées §1.4, abordons directement l'analyse urinaire en tant que tel :

### **1.5.1 Analyses des caractères physiques urinaires**

Ces analyses portent principalement sur la couleur, la turbidité, le volume et la densité de l'urine.

### 1.5.1.1 Couleur

Typiquement, l'urine est normalement de couleur jaune transparent ou ambre lors de l'évaluation visuelle (Callens and Bartges 2015). La présence d'urochromes et d'urobiline est responsable de la couleur ambrée de l'urine. Parce que le rythme d'excrétion urinaire d'urochrome est constant, la coloration de l'urine est plus claire lorsqu'elle est diluée (par exemple, après réhydratation) et plus foncée lorsqu'elle est concentrée. L'intensité de la couleur étant en partie liée au volume d'urine collecté et à la concentration de l'urine produite, elle doit être interprétée en tenant compte de la densité urinaire (Callens and Bartges 2015). L'urine peut cependant être anormalement colorée, traduisant un processus pathologique spécifique. Une coloration blanchâtre de l'urine peut être observée lors de pyurie, et la présence de *Pseudomonas aeruginosa* peut conférer une couleur verte à l'urine. Ces colorations sont cependant très rares (Maurey 2005). En revanche, une coloration urinaire rouge ou brunâtre est observée dans plusieurs situations cliniques :

- hématurie macroscopique ;
- hémoglobinurie ;
- myoglobinurie ;
- bilirubinurie ;

L'étiologie de ces situations cliniques est envisagée plus loin. Enfin, des colorants alimentaires, vitaminiques ou médicamenteux peuvent expliquer une coloration rougeâtre de l'urine.

### 1.5.1.2 Volume et densité

Pour évaluer le volume urinaire, il est nécessaire de prélever la totalité des urines émises pendant 24 heures. Lors d'une hospitalisation, cette méthode semble réalisable. Un chien adulte produit entre 24 et 40 ml/kg/j ; chez le chat, ce volume est de 15 à 20 ml/kg/j (Maurey 2005). Une augmentation du volume urinaire est qualifiée de polyurie, une diminution de ce volume est une oligurie et un arrêt de l'émission d'urine est une anurie. On distingue l'anurie liée à un obstacle (anurie excrétoire) d'une anurie vraie (anurie sécrétoire).



La densité urinaire est définie comme le rapport entre le poids du volume d'urine et le poids d'un volume égal d'eau distillée ; donc, elle dépend du nombre, de la taille et du poids des particules dans l'urine.

La densité urinaire se mesure au moyen d'un réfractomètre ; il est déconseillé de la mesurer au moyen d'une bandelette (Maurey 2005, Callens and Bartges 2015). Elle traduit la capacité du rein à concentrer ou non l'urine. Chez le chien, sa valeur normale se trouve entre 1,015 et 1,045, et chez le chat, entre 1,035 et 1,060.

Chez les animaux sains, la densité urinaire est très variable (de 1,001 à 1,07). Elle est fonction de l'état d'hydratation de l'animal et de son équilibre électrolytique. L'interprétation de la valeur de la densité urinaire doit se faire en tenant compte d'autres paramètres de l'examen clinique tels que la prise de boisson, l'état d'hydratation et les valeurs sanguines par exemple.

On distingue :

- l'hypersthénurie : urine fortement concentrée, par exemple en cas de déshydratation ou d'un défaut de perfusion rénale (insuffisance rénale prérénale) ;
- l'hyposthénurie : urine fortement diluée (densité urinaire inférieure à 1,007), notamment lors de diabète insipide central, de diabète insipide néphrogénique ou en cas de potomanie ;
- l'isosthénurie : urine présentant une densité similaire à celle du filtrat glomérulaire (densité allant de 1,007 à 1,012).

La mesure de la densité urinaire présente plusieurs intérêts :

- l'interprétation et la modulation des mesures d'autres paramètres (protéinurie, cylindrurie) ;
- la détection d'un défaut de concentration rénale : chez l'espèce canine, la baisse du pouvoir de concentration est un signe précoce (précédant l'augmentation de l'urée et de la créatinine) d'insuffisance rénale ;
- l'exploration d'un syndrome polyuropolydispique ;
- la localisation prérénale, rénale ou postrénale d'une urémie (Maurey 2005).

### 1.5.1.3 Analyses des propriétés chimiques urinaires

Des bandelettes réactives telles que Multistix® (Siemens Healthcare, Erlangen, Allemagne) ou Chemstrip® (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) peuvent être utilisées pour effectuer différentes évaluations chimiques semi-quantitatives simultanément. En médecine vétérinaire, elles sont couramment utilisées pour déterminer les valeurs urinaires du pH, des protéines, du glucose, des corps cétoniques, de la bilirubine, de l'urobilinogène et du sang. Généralement, les bandelettes incluent des plages de test pour la leucocyte estérase (pour la détection des leucocytes), les nitrites (pour la détection des bactéries) et pour la détection de la densité urinaire. Ces plages-ci ne sont pas valables chez les animaux et ne doivent pas être utilisées (Callens and Bartges 2015). Les bandes de réactifs sont affectées par l'humidité et ont une durée de vie limitée. Les bouteilles doivent être bien fermées et les bandelettes non utilisées doivent être jetées après leur date de péremption.

Simple à pratiquer, ces évaluations chimiques nécessitent somme toute des conditions rigoureuses de réalisation : une fois plongée dans l'urine, la bandelette doit être immédiatement retirée. Un délai de 30 secondes (maximum : 2 minutes) est généralement préconisé avant la lecture de la bandelette (Maurey 2005).

#### *Caractère acido-basique*

Les valeurs de pH mesuré vont de 5 à 9. Le pH urinaire normal d'un carnivore domestique est compris entre 5,5 et 7. La mesure du pH à l'aide de bandelettes est typiquement fiable à  $\pm 0,5$  unité pH (Heuter, Buffington et al. 1998). Les pH-mètres électroniques sont plus fiables que les plages de réactions colorimétriques (Callens and Bartges 2015).

Il existe des variations de pH physiologiques, pathologiques et médicamenteuses. La connaissance du pH urinaire est intéressante dans plusieurs situations cliniques :

- aide à la détermination de la nature d'une urolithiase ;
- interprétation d'autres paramètres mesurés (une urine très basique peut entraîner une réaction positive à la plage protéine) ;
- suspicion de la présence d'un germe uréase positif si l'urine est fortement basique (Maurey 2005).

## ***Glucose***

Le glucose est mis en évidence sur les bandelettes par une réaction spécifique à la glucose oxydase couplée à la peroxydase. Les bandelettes réagissent généralement à partir de 0,4 g/L (avec des variations selon les bandelettes utilisées). Normalement, il n'y a pas de glucosurie présente car le seuil rénal pour le glucose est supérieur à 1,8 g/L (ou 10 mmol/L) dans la plupart des espèces, y compris chez le chien. Chez le chat, ce seuil est encore plus élevé : 2,2 g/L (ou 14 mmol/L).

La présence de glucose dans l'urine est donc observée dans deux situations :

- hyperglycémie supérieure au seuil rénal ;
- atteinte tubulaire primitive avec défaut de réabsorption du glucose par le tubule (Maurey 2005).

La glucosurie de stress est fréquemment observée chez l'espèce féline. Afin de ne pas diagnostiquer à tort un diabète sucré, un dosage de fructosamine peut être effectué.

Des résultats faussement positifs ont été décrits sur des bandelettes conservées à l'air libre et dans l'urine de chats ayant une obstruction urétrale. Il existerait dans l'urine de ces derniers un composé inconnu, le « pseudoglucose », capable d'entraîner une réaction faussement positive de la plage glucose (Cotard 1993) .

## ***Corps cétoniques***

Les principaux corps cétoniques retrouvés dans l'urine sont l'acétone, l'acide acétoacétique et l'acide  $\beta$ -hydroxy-butyrique. La réactivité des bandelettes urinaires est généralement basée sur la réaction de l'acétone et de l'acide cétoacétique avec le nitroprussiate. Cette réaction ne détecte cependant pas l'acide  $\beta$ -hydroxy-butyrique. Le dosage des corps cétoniques dans l'urine est particulièrement indiqué chez les patients atteints de diabète sucré ; afin de surveiller une éventuelle complication en diabète acidocétosique.

## ***Bilirubine***

La bilirubine est un composé jaune orangé dérivé de la dégradation de l'hémoglobine et des hémoprotéines. La bilirubinurie est plus fréquente chez le chien que chez le chat, le chat ayant ce seuil rénal 9 fois plus élevé que celui du chien. De plus, il existe chez

le chien une conjugaison tubulaire de la bilirubine libre en bilirubine conjuguée qui est directement excrétée dans l'urine, processus qui semble deux fois plus important chez mâle. Une lecture de 1+ de bilirubinurie chez un chien avec une densité urinaire normale est considérée comme physiologique. En revanche, il n'existe pas de bilirubinurie physiologique chez le chat (Maurey 2005), espèce chez qui la détection d'une bilirubinurie sera toujours significative. Une bilirubinurie augmentée oriente vers :

- une maladie hémolytique ;
- une insuffisance hépatocellulaire ;
- une obstruction des canaux biliaires.

### ***Protéines***

Le rôle du rein est majeur dans la conservation des protéines, la barrière glomérulaire bloquant les protéines dont le poids moléculaire est supérieur à 70 kD. Les protéines plasmatiques filtrées sont en partie réabsorbées par le tubule proximal. Les protéines urinaires sont constituées de protéines sériques non réabsorbées (notons que 40 à 60 % de l'albumine filtrée n'est pas réabsorbée), de protéines tubulaires (immunoglobuline, protéine de Tamm Horsfall), et de protéines provenant du bas appareil urinaire et de l'appareil génital selon les modalités de prélèvement utilisées. Notons effectivement que la contamination de l'échantillon urinaire par du sang peut interagir avec la réaction de la plage protéines. L'interprétation d'une protéinurie n'est possible que si une atteinte inflammatoire du bas appareil urinaire a été exclue ; pour cette raison un prélèvement urinaire par cystocentèse est préférable (Maurey 2005).

L'interprétation semi-quantitative de la bandelette urinaire doit toujours être accompagnée de la mesure de la densité urinaire. Ainsi, une quantité faible de protéines ( $\leq 1+$ ) associée à une densité de 1,035 peut être considérée comme normale.

Ce test est particulièrement sensible pour l'albumine mais n'a qu'une faible détection pour d'autres protéines, notamment les globulines et certaines chaînes légères d'immunoglobulines. D'autres tests (des tests de précipitation à l'acide nitrique [réaction de Heller] ou à l'acide sulfosalicylique) peuvent être utilisés en parallèle. L'épaisseur de l'anneau formé (réaction de Heller) ou le degré de l'opacification de

l'urine (acide sulfosalicylique 5 %) sont proportionnels à la quantité de protéines urinaires.

Le ratio protéines urinaires/créatinine urinaire (RPCU) permet d'interpréter une protéinurie. Un  $RPCU > 1$  est anormal chez les carnivores domestiques (Callens and Bartges 2015). Tandis qu'un RPCU très élevé (plus grand que 4 chez le chat et 5 chez le chien) est un élément en faveur d'une amyloïdose, l'interprétation d'un rapport plus faible est sujette à discussion : un  $RPCU = 3$  est par exemple compatible avec une néphrite interstitielle ou une glomérulonéphrite. Enfin, s'il est désormais possible de réaliser le dosage des protéines urinaires et de la créatinine urinaire au sein même d'un cabinet, il est établi que tous les automates ne présentent pas le même degré de fiabilité que les tests de laboratoire de référence (Maurey 2005).

La protéinurie peut être d'origine pré-rénale (hyperthermie, exercice intense, convulsions, température ambiante extrême et hyperprotéïnémie), d'origine rénale (principalement lors de maladie glomérulaire et parfois tubulaire) ou post-rénale (inflammation, hémorragie et infection).

### ***Sang hémoglobine, myoglobine***

L'hémoglobine et de la myoglobine agissent comme des pseudo-péroxydases. C'est cette activité qui est détectée par la bandelette : en présence d'hémoglobine et de myoglobine, la 3,3',5,5'-tetraméthylbenzidine (TMB) contenue dans les bandelettes va prendre une couleur bleue.

La centrifugation de l'urine est un moyen simple de distinguer une hématurie vraie (les hématies sédimentent dans le culot et le plasma est incolore, à l'exception lors de certains cas d'hémolyse) d'une hémoglobinurie ou d'une myoglobinurie (la coloration reste uniforme après la sédimentation). La distinction entre hémoglobinurie et myoglobinurie est essentiellement clinique.

### *Hématurie*

Les causes d'hématurie sont nombreuses (cf. §1.2). Il est normal de retrouver une petite quantité de globules rouges dans l'urine, à savoir moins de 5 à 15 GR/CFG x400 (Forrester 2004). Un examen du culot de centrifugation permet de confirmer une hématurie pathologique.

### *Hémoglobinurie*

L'hémoglobinurie résulte soit d'une hémoglobinémie (en cas de lyse intravasculaire), soit d'une hémolyse intra-urinaire. Lors de lyse intravasculaire, l'hémoglobine libérée dans le courant sanguin est normalement liée à l'haptoglobine. Ce complexe de haut poids moléculaire (>40kDa) ne transite pas par le filtre glomérulaire. En cas de lyse intense, ce mécanisme de fixation est saturé et de l'hémoglobine, alors libre, va circuler dans le plasma, être filtrée par le glomérule, puis réabsorbée et métabolisée par les cellules tubulaires proximales jusqu'à un seuil maximal. Lorsque ce mécanisme de réabsorption est lui aussi saturé, l'hémoglobinurie apparaît.

Par ailleurs, un certain nombre de globules rouges peuvent subir une hémolyse à l'intérieur même des voies excrétrices (hémolyse intra-urinaire). Cette hémolyse intra-urinaire résulte principalement de deux mécanismes : une densité urinaire réduite (<1,015) et un pH très basique. Cette lyse est exacerbée si l'analyse est faite après un certain délai (Stockham and Scott 2008).

### *Myoglobinurie*

La myoglobine est une métalloprotéine présente dans les cellules musculaires, responsable du transport de l'oxygène au sein de la cellule. Une myoglobinurie témoigne toujours d'une myoglobinémie. La libération plasmatique de ce pigment se produit après une nécrose des fibres musculaires d'origine traumatique, ischémique ou toxique (Maurey 2005). La myoglobinurie est rarement observée chez les carnivores domestiques.

#### **1.5.1.4 Analyse microscopique**

L'examen du sédiment urinaire est particulièrement intéressant pour détecter la présence de globules rouges, de leucocytes, de cylindres, de cristaux et, plus rarement, de parasites (Maurey 2005). Cet examen devrait systématiquement faire partie de l'analyse urinaire de routine (Callens and Bartges 2015).

#### ***Réalisation***

Il est nécessaire de centrifuger l'échantillon urinaire à basse vitesse, autour de 962g (soit généralement entre 1500 et 3300 tours par minute selon les centrifugeuses)

pendant 5 minutes. Un volume standard d'urine (5 ml) est nécessaire à une interprétation quantitative. Le surnageant est aspiré à l'aide d'une pipette afin de ne laisser que quelques gouttes de l'urine sédimentée (entre 0,5 et 1mL), que l'on va remettre en suspension. Si l'on souhaite pratiquer une coloration, il est souhaitable de séparer le prélèvement en deux aliquots pour observer dans un premier temps le sédiment sans coloration (Maurey 2005). Pour l'observation microscopique, une goutte du sédiment est déposée entre lame et lamelle. Un examen à faible grossissement x100 permet de détecter la présence des différents éléments (cristaux, cylindres et cellules). Le fort grossissement x400 est souvent nécessaire pour déterminer la morphologie cellulaire, et pour identifier les cristaux et les cylindres présents (Maurey 2005, Callens and Bartges 2015). La coloration peut aider plus particulièrement à la reconnaissance des structures cellulaires (Sedistain®, bleu de toluidine 0,5 %).

### ***Interprétation***

#### *Éléments normaux*

Certains éléments peuvent être trouvés dans le sédiment urinaire sans signification pathologique, c'est par exemple le cas des cellules épithéliales et des spermatozoïdes, ainsi que des globules rouges et des leucocytes si ces derniers sont retrouvés en petite quantité.

#### *Éléments anormaux*

- Cellules : Une augmentation des globules rouges est signe d'une hémorragie quelque part dans le tractus urinaire. La présence de leucocytes évoque une inflammation. L'association d'une leucocyturie et d'une bactériurie est signe d'une infection du tractus urinaire ; la visualisation directe des bactéries doit cependant être interprétée avec précaution à cause de nombreux faux positifs (Maurey 2005).

Des cellules épithéliales anormales peuvent évoquer un carcinome vésical ou urétral. Toutefois, ce diagnostic doit être réservé au cytologiste ou au pathologiste. Des cellules tumorales ne sont visualisées que dans 30 % des cas de carcinome transitionnel. Un dosage d'une protéine tumorale vésicale dans l'urine est possible pour les animaux suspects de carcinome transitionnel : Le

Veterinary-Bladder tumor antigen Test (V-BTA). C'est un test immunochromatographique, détectant une protéine produite par de nombreuses lignées de cellules cancéreuses. Le test montre une sensibilité de 90% et une spécificité de 94.4% pour différencier des chiens présentant des tumeurs du bas appareil urinaire de chiens sains ; cependant sa spécificité est seulement de 35% pour différencier les chiens atteints de tumeurs des chiens présentant des affections urinaires non néoplasiques (Billet, Moore et al. 2002). Par conséquent il ne constitue pas un examen intéressant pour obtenir un diagnostic de certitude.

- Cylindres : Les cylindres sont des agglomérats de protéines et de cellules précipitées, moulées dans la lumière tubulaire. Ces cylindres ont ainsi une forme caractéristique et des bords réguliers les distinguant des amas cellulaires. Tous les cylindres ont une matrice protéique composée essentiellement de la mucoprotéine de Tamm Horsfall. Lorsque la lumière tubulaire ne comporte pas de cellule, le cylindre est composé presque exclusivement de matrice (Maurey 2005). Ces cylindres sont dits hyalins et ont peu de valeur diagnostique (à l'exception des cylindres dits « de cire » ou « waxy cast », indicateurs d'une lésion chronique : les cellules deviennent granulaires et ensuite disparaissent, laissant ces cylindres de cires). Les cylindres cellulaires (hématiques, leucocytaires, épithéliaux) ont en revanche une grande valeur sémiologique, identifiant une lésion rénale, mais ne témoignent pas de l'intensité ou de la réversibilité de la lésion (Maurey 2005). Des éléments organiques (protéines, lipides) peuvent être observés.
  
- Cristaux : Un grand nombre de cristaux peuvent être observés dans le sédiment urinaire. Les plus fréquents sont les cristaux de phosphates ammoniacomagnésiens, d'oxalate de calcium, d'urates, de cystine et de phosphate de calcium. Leur présence dépend du pH urinaire et de la sursaturation de l'urine en substances cristalloïdes (Maurey 2005). Une légère cristallurie peut être observée chez des sujets asymptomatiques, elle n'a dans ces cas que peu de valeur sémiologique. Excepté lorsqu'il s'agit de cristaux de cystine ou d'urate, indicateurs d'anomalies métaboliques. Enfin, il est fréquent qu'une



crystallisation spontanée apparaisse sur des urines conservées au réfrigérateur ou à température ambiante pendant quelques heures. La détection de cristaux doit donc être réalisée sur de l'urine fraîche.

L'évaluation de la cristallurie permet peut permettre :

- la recherche d'un éventuel calcul (la nature de la cristallurie ne reflète pas significativement la nature du calcul) ;
  - la détection d'une anomalie métabolique (par exemple des urates chez animal souffrant d'insuffisance hépatique) ;
  - le suivi d'un régime calculolytique via la caractérisation de la cristallurie.
- Bactéries : La détection des bactéries dans le sédiment urinaire est délicate, même avec des colorants spécifiques, les bactéries pouvant être confondues avec de nombreux éléments. Une culture bactériologique reste la meilleur option pour confirmer une infection (Callens and Bartges 2015). La méthode de prélèvement et les conditions de conservation sont autant de paramètres pouvant expliquer la présence d'éléments contaminants, un recueil stérile d'urine par cystocentèse et l'utilisation de matériel stérile sont deux éléments indispensables (Maurey 2005).
- Parasites : Très rarement, des œufs de parasites urinaires (*Dioctophyma renale*, *Capillaria plica*), ou des microfilaires, sont observés (Maurey 2005).

## **1.6 Etude toxicologique du produit**

Une étude toxicologique a été réalisée au préalable afin d'évaluer le profil toxicologique des substances contenues dans les granules du test de dépistage, et également d'effectuer une analyse de risque (del Castillo J.R.E., rapport interne 2017).

Le résultat de cette analyse de risque a conclu que le risque pour le chat ainsi que pour le manipulateur pouvait être qualifié de négligeable à très faible.

Il a tout de même été recommandé d'annoter « Attention ne pas inhaler. Conserver hors de la portée des enfants. » sur les emballages.

## **1.7 Evaluation d'un test de dépistage**

### **1.7.1 Introduction**

Généralement, la démarche du praticien est de répondre à une demande de la part du patient : cette démarche aboutit le plus souvent à un diagnostic et à la mise en place d'un traitement. Lorsqu'il s'agit de faire un diagnostic de masse, sur un groupe ciblé, la démarche est différente : il est rarement possible de soumettre chaque sujet à un examen clinique détaillé voire à plusieurs examens complémentaires, procédures potentiellement longues et coûteuses. On doit donc se contenter le plus souvent de procédures plus simples et plus rapides, même si elles peuvent être associées à un certain taux d'erreur « acceptable » (Søreide, Bharti et al. 2009, Arnaud 2010).

L'objectif du dépistage est d'améliorer la santé des individus par le diagnostic précoce des maladies à un stade où ces dernières sont curables ou lorsque leurs conséquences peuvent encore être limitées.

### **1.7.2 Définition**

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S.), le dépistage consiste à identifier de manière présomptive à l'aide de tests rapides les sujets atteints d'une maladie ou d'une anomalie jusque-là passée inaperçue (Arnaud 2010).

Un test de dépistage doit permettre de distinguer les individus apparemment en bonne santé mais qui sont probablement malades (M+) des individus sains ou non-malades (M-). Un test de dépistage n'a pas de but diagnostique.

Le dépistage est donc une démarche de prévention secondaire. C'est le praticien médical qui prend l'initiative de le recommander chez certains patients, et il ne constitue qu'une étape avant le diagnostic définitif.

### **1.7.3 Critères de recours au dépistage**

Le dépistage doit répondre à un certain nombre de critères définis par l'O.M.S., tels que les « 10 principes servant au choix d'un programme de dépistage ». Nous pouvons les valider dans la situation présente, à savoir la détection par le test étudié de la microhématurie chez le chat dans le cadre de la gestion des ABAU (Tableau II).

*Tableau II. Parallèle entre les dix principes du choix d'un programme de dépistage selon l'O.M.S. et les principes de la détection rapide de la microhématurie chez le chat avec le test étudié dans le cadre de la gestion des ABAU (situation présente)*

**1. O.M.S. La maladie dépistée doit constituer une réelle menace pour la santé.**

✓ Situation présente : la fréquence et la gravité des ABAU chez le chat font de ces affections une réelle menace en santé animale (cf. §1.1).

**2. O.M.S. Il doit exister un traitement d'efficacité démontrée.**

✓ Situation présente : selon le type d'ABAU, des traitements efficaces peuvent être mis en place par le vétérinaire (cf. §1.1).

**3. O.M.S. Il faut disposer de moyens appropriés de diagnostic et de traitement.**

✓ Situation présente : ces moyens existent dans le cadre des ABAU (cf. §1.1).

**4. O.M.S. La maladie doit être décelable pendant une phase de latence ou au début de la phase clinique.**

✓ Situation présente : il semblerait que la microhématurie soit généralement présente au début de l'évolution des ABAU, parfois avant que les chats n'expriment de signes de douleur (cf. §1.1.5 et 1.8).

**5. O.M.S. Il existe un examen de dépistage efficace.**

✓ Situation présente : l'efficacité de l'épreuve de dépistage ici étudiée a été validée par l'étude de ce mémoire (cf. §4).

**6. O.M.S. Il faut que l'épreuve utilisée soit acceptable pour la population.**

✓ Situation présente : le produit est non toxique (cf. §1.6), et son utilisation est non-invasive et sans stress pour l'animal (cf. §1.8).

**7. O.M.S. Il faut bien connaître l'histoire naturelle de la maladie.**

✓ Situation présente : les ABAU félines sont connues et documentées (cf. §1.1).

**8. O.M.S. Il faut que le choix des sujets qui recevront un traitement soit opéré selon des critères préétablis.**

✓ Situation présente : ces critères préétablis sont disponibles dans les recommandations de spécialistes (Scherk, Buffington et al. 2018).

**9. O.M.S. Il faut que le coût de la recherche des cas ne soit pas disproportionné par rapport au coût global des soins médicaux.**

✓ Situation présente : le coût d'un tel test de dépistage est modéré par rapport au coût d'une hospitalisation de l'animal / d'une chirurgie, par exemple en cas d'obstruction (cf. §1.1).

**10. O.M.S. Il faut assurer la continuité d'actions dans la recherche des cas et non la considérer comme une opération exécutée « une fois pour toutes ».**

✓ Situation présente : les recommandations des spécialistes quant à l'utilisation du produit sont bien d'assurer un suivi au long terme (Scherk, Buffington et al. 2018).

## 1.7.4 Évaluation d'un test de dépistage

Actuellement, de nombreuses procédures de dépistage existent, mais très peu ont été validées (Arnaud 2010).

### 1.7.4.1 Généralités

L'évaluation d'un test de dépistage se fait en trois temps :

- évaluer son pouvoir de repérage des malades, son aptitude à discriminer les patients M+ des patients M-,
- évaluer si un tel repérage modifie l'histoire naturelle de la maladie,
- rechercher à quel coût ces résultats sont obtenus.

### 1.7.4.2 Valeur intrinsèque d'un instrument de mesure

Les deux principales qualités d'un test, qui définissent la « validité interne de l'instrument de mesure », sont :

- la sensibilité : capacité du test à identifier les sujets M+ ;
- la spécificité : capacité du test à identifier les sujets M-.

### 1.7.4.3 Cas qualitatif

Dans le cas d'un test de nature qualitative pour lequel la réponse est binaire (positif/négatif), la sensibilité et la spécificité sont fixes. La confrontation des résultats entre le test à évaluer et le test de référence est en général présentée dans un tableau de contingence. Le tableau III présente en guise d'exemple l'épreuve de dépistage ici étudiée, en considérant la réponse de l'épreuve comme binaire.

Tableau III. Tableau de contingence confrontant les résultats du test à évaluer aux résultats du test de référence

		Test de référence	
		Avec hématurie	Sans hématurie
Test étudié	Test positif	Vrais positifs (VP)	Faux positifs (FP)
	Test négatif	Faux négatifs (FN)	Vrais négatifs (VN)

Dans une situation idéale, le test permet de classer correctement tous les sujets. Cependant, dans la plupart des cas, le classement des sujets dans le groupe des malades et des non malades s'accompagne d'un certain taux d'erreur (Arnaud 2010).

On définit la sensibilité et la spécificité de la manière suivante :

- Sensibilité = Probabilité d'avoir un test positif quand on est malade : c'est donc la proportion de vrais positifs parmi les malades.

$$Se = \frac{VP}{VP + FN}$$

- Spécificité = Probabilité d'avoir un test négatif quand on est non malade. C'est donc la proportion de vrais négatifs parmi les non malades.

$$Sp = \frac{VN}{VN + FP}$$

Sensibilité et spécificité sont des proportions : elles ne peuvent donc varier qu'entre 0 et 1 (0 et 100%). Un test est dit « sensible » si le nombre de faux négatifs est faible, il est dit « spécifique » dans le cas où le nombre de faux positifs est faible.

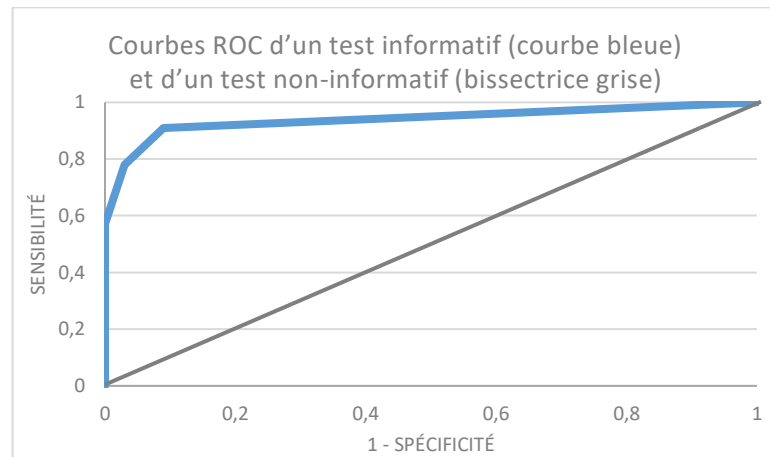
#### 1.7.4.4 Tests quantitatifs

Ce sont les tests les plus fréquents. Les valeurs de la sensibilité et de la spécificité dépendent du seuil de décision choisi (Hajian-Tilaki 2013).

Quand le résultat du test s'exprime par une variable continue et en faisant varier le seuil, on peut tracer l'ensemble des points (sensibilité, spécificité) qui représentent la courbe ROC (Receiver Operating Curve, ou fonction d'efficacité du récepteur). En abscisse est porté le taux de faux positifs (1-Spe) et en ordonnée la valeur correspondante du taux de vrais positifs (Se). Chaque point de la courbe correspond à une valeur seuil.

Un test non informatif est représenté par la bissectrice qui correspond à la situation où sensibilité et spécificité sont égales à 50%. Plus un test est informatif, plus la courbe ROC atteindra le quadrant supérieur gauche du graphique (Figure 4).

Figure 4. Exemple de fonction d'efficacité du récepteur ou « courbes ROC »



L'information contenue dans la courbe ROC est « résumée » en un indice : l'aire sous la courbe. L'aire sous la courbe ROC est égal à la probabilité que le score du sujet pathologique soit supérieur au score du sujet normal. Elle varie donc de 0,5 (absence d'information) à 1 (discrimination parfaite) et indique la fiabilité du test, c'est-à-dire sa capacité à classer correctement un sujet.

#### 1.7.4.5 Évaluation du pouvoir de repérage des malades : les valeurs de prédiction

Nous avons vu qu'un test de dépistage ne permet pas, en règle générale, de confirmer la présence ou l'absence d'une maladie dans la mesure où la sensibilité et la spécificité ne sont pas égales à 100%. Pour connaître le degré de confiance que l'on peut accorder au test dans une population donnée, on se sert des valeurs prédictives :

- La valeur prédictive positive (VPP) : c'est la proportion de vrais positifs parmi l'ensemble des résultats positifs au test.

$$VPP = \frac{VP}{VP + FP}$$

- La valeur prédictive négative (VPN) : c'est la proportion de vrais négatifs parmi l'ensemble des résultats négatifs au test.

$$VPN = \frac{VN}{VN + FN}$$

Contrairement à la sensibilité et à la spécificité, les valeurs prédictives du test ne sont pas constantes, mais dépendent de la prévalence de la maladie dans la population.

### **1.7.5 Effets bénéfiques du dépistage en population**

Rappelons que l'objectif d'un dépistage est d'identifier précocement les sujets malades afin de les traiter et d'obtenir une guérison plus rapide ou d'augmenter l'espérance de vie. Si la date du décès n'est pas favorablement modifiée, l'objectif peut être d'améliorer la qualité de la survie.

Concernant le produit étudié ici, ces effets bénéfiques sont actuellement en cours d'évaluation. Selon les informations dont nous disposons à l'heure actuelle, la tendance semble très bonne à la fois concernant l'aspect sur la santé animale et l'aspect sur les effets perçus par le vétérinaire et le propriétaire.



## 1.8 Description du produit testé

### 1.8.1 Caractéristiques du produit

Ce test non-invasif dépistant l'hématurie féline qui vient d'être mis sur le marché s'appelle Blücare®, de Blücare Lab Inc, Boucherville, Québec. Se voulant facile d'utilisation, sans stress pour l'animal, il consiste en des granules blancs, à saupoudrer sur la litière du chat (Figure 5). Ces granules sont destinés à devenir bleus rapidement au contact de l'hémoglobine. Le guide d'utilisation du test explique qu'il fonctionne dès le stade de la microhématurie (Blücare Lab 2019).

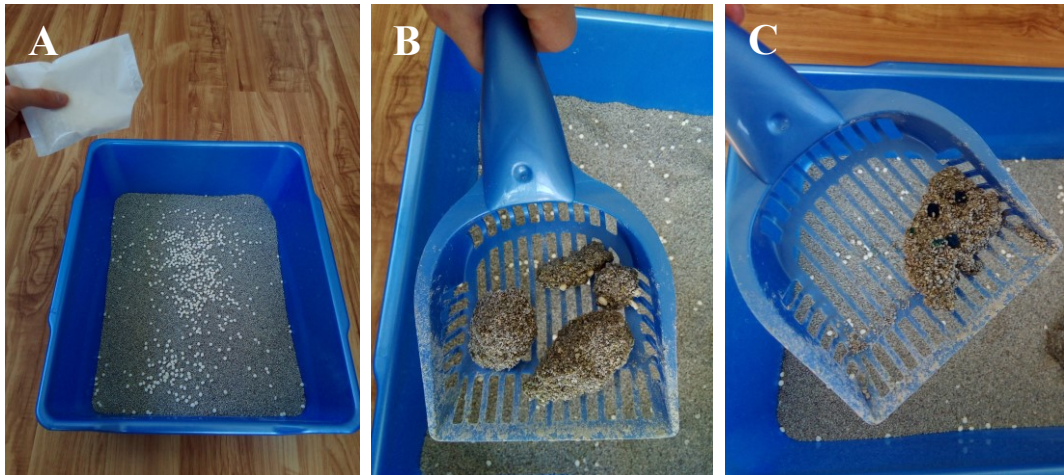
*Figure 5. Dispersion des granules sur la litière*



Photo de Blücare Lab Inc

Le test Blücare est composé de petits granules blancs à saupoudrer sur la litière du chat. Le test se veut compatible avec tout type de litière. Les granules contiennent de la 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), molécule conférant une coloration bleue aux granules via une réaction de pseudo-peroxydation lorsqu'elle entre en contact avec de l'hémoglobine ou de la myoglobine (Figure 6).

Figure 6. Visuel des granules : saupoudrés sur de la litière (A), souillés par de l'urine saine (B) et souillés par de l'urine hématurique (C)

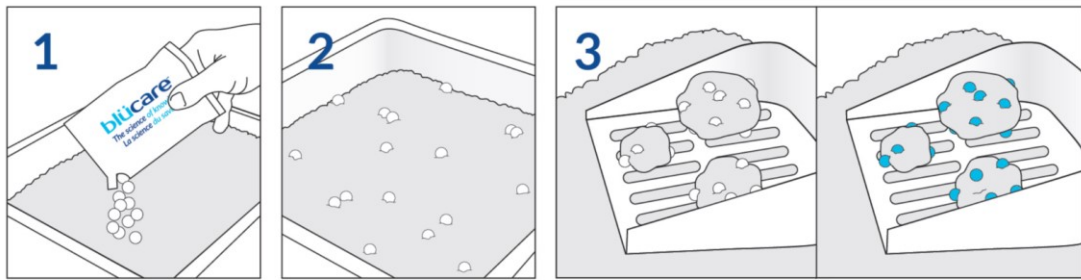


D'après le fabricant, les résultats sont quasi immédiats et restent visibles pendant plus de 48h. Les instructions d'utilisations sont détaillées Figure 7.

Après avoir reçu les résultats de l'étude et avant d'appuyer la commercialisation du produit, le fabricant a demandé à un groupe d'experts en médecin féline de se réunir afin d'établir des recommandations d'utilisation des granules (Scherk, Buffington et al. 2018). Ces experts ont notamment établi des recommandations de fréquence d'utilisation du produit selon la population ciblée.

Toujours selon le fabricant, la durée de vie du produit est de 2 ans dans le sachet scellé et de 30 jours après ouverture. Les granules restent efficaces 30 jours même s'ils sont déposés sur la litière du chat ; cependant il est recommandé au propriétaire de veiller à retirer quotidiennement les granules souillés par de l'urine, ces derniers n'étant plus absorbants après avoir été touchés par une première miction.

Figure 7. Résumé en images des instructions d'utilisation du produit



#### SPRINKLE

one pouch of Blücare on fresh litter in a clean litter box.

A clay-based clumping litter is recommended.

**SAUPOUDRER** un sachet de Blücare sur de la litière fraîche, dans un bac propre.

Une litière agglomérante à base d'argile est recommandée.

#### CLEAN LITTER BOX

daily with a litter shovel as usual and observe the Blücare granules that are soiled by urine.

**NETTOYER** comme d'habitude quotidiennement la litière avec une pelle à litière, et observer les granules qui ont été souillés par de l'urine.

#### SEE THE RESULT

##### WHITE granules:

Negative test (no blood detected).

##### BLUE granules:

Positive test (blood detected).



Owners should contact their veterinarian for further evaluation.

#### OBSERVER LES RESULTATS

##### Granules BLANCS :

Test négatif (pas de sang détecté).

##### Granules BLEUS :

Test positif (du sang a été détecté).

Il est conseillé aux propriétaires de contacter leur vétérinaire pour une évaluation approfondie.

Image adaptée de Blücare Lab (Blücare Lab 2019)

## 1.8.2 Produits de la même catégorie sur le marché

Actuellement, Blücare semble être le seul test sur le marché capable de détecter la microhématurie féline à la maison, directement sur la litière, sans nécessité de récolte d'urine au préalable.

D'autres tests, permettant une évaluation de l'urine du chat à la maison par le propriétaire, existent sur le marché. Une liste non-exhaustive est présentée Tableau IV.

Tableau IV. Exemple de produits permettant une évaluation de certains paramètres urinaires par le propriétaire, comparatif avec Blücare®

Technologie	Comparatif avec Blücare®	
	Caractéristiques supplémentaires	Caractéristiques manquantes
<b>Litières non-absorbantes (ex : Katkor®, Nosorb®, Kit4cat®) + évaluation à l'aide d'une bandelette</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• permettent la détection de plusieurs paramètres urinaires (sang, glucose, protéines etc.) ;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ne permettent pas une lecture sans récolte d'urine au préalable ;</li> <li>• ne peuvent pas être utilisées avec tout type de litière ;</li> <li>• ne permettent pas l'interprétation des résultats si l'analyse est faite plus de 2h après la miction ;</li> </ul>
<b>Litières de silice dites « surveillant la santé » (ex : PrettyLitter®, Nullodor®, Perlinette suivi santé®)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• permettent une mesure du pH urinaire ;</li> <li>• permettent de remarquer un changement de coloration urinaire ;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ne dépistent pas la microhématurie ;</li> <li>• ne permettent pas l'interprétation des résultats si l'observation est faite plus de 2h après la miction.</li> </ul>

## 1.9 Conclusion de la revue de la littérature

Les affections du bas appareil urinaire chez le chat sont des pathologies fréquentes, évolutives et récurrentes ; or elles ne sont pas toujours faciles à détecter rapidement par les propriétaires.

L'hématurie, au moins sous forme d'hématurie microscopique, est quasi-systématiquement présente lors de désordres urinaires, ce qui en fait un bon potentiel biomarqueur précoce de ces pathologies.

La récolte de l'urine de chat étant cependant compliquée, les moyens de suivi faciles des affections urinaires félines étaient limités. Un nouveau test de dépistage de l'hématurie féline, composé de petits granules à saupoudrer directement à même la litière du chat, fait ici l'objet d'une étude détaillée.

## **2. PROBLEMATIQUE**

### **2.1 Problème**

La surveillance de l'hématurie microscopique chez le chat pourrait se révéler bénéfique dans la gestion des ABAU. Un nouveau produit offre la possibilité de dépister la microhématurie à la maison, à même la litière, sans passer par une manipulation de l'urine. Nous nous sommes proposés d'évaluer la fiabilité de ce produit.

### **2.2 Objectifs**

Le but du projet était de déterminer pour ce test à la fois son seuil de dépistage de l'hématurie et sa fiabilité dans le cadre d'un suivi du statut hématurique de chats sujets à des affections du bas appareil urinaire. Plus précisément, les objectifs étaient de déterminer à partir de quelle concentration en globules rouges le test répondait de façon positive ; ainsi que de déterminer la sensibilité, la spécificité du test de dépistage (valeurs intrinsèques au test), la valeur prédictive positive et la valeur prédictive négative du test dans le cadre de notre population cible.

### **2.3 Hypothèse**

Nous avons soumis l'hypothèse que le test de dépistage ici étudié possède les caractéristiques métriques nécessaires à un suivi clinique de l'hématurie chez les chats ayant un historique de maladie du bas appareil urinaire, c'est-à-dire un seuil de dépistage bas (capable de détecter de la microhématurie à des valeurs cliniquement pertinentes), une bonne sensibilité ( $\geq 90\%$ ), spécificité ( $\geq 90\%$ ), et des bonnes valeurs prédictives positive et négative.

### **3. ETUDES PRELIMINAIRES ET AUTRES RESULTATS**

#### **3.1 Etudes préliminaires sur le prototype du produit**

Une étude ex-vivo en 2 phases a été réalisée sur un prototype du produit par les Dr Gara-Boivin C. et Dr del Castillo J.R.E., de l'Université de Montréal.

L'objectif de cette étude était de déterminer le seuil de détection de l'hématurie de ce prototype, ainsi que de vérifier sa robustesse face à une altération de la composition urinaire.

##### **3.1.1 Seuil de détection**

Les résultats ont été publiés sous forme de poster au congrès annuel de l'« American College of Veterinary Pathologists », à la Nouvelle-Orléans, Louisiane, USA, en décembre 2016 (Khenifar, del Castillo et al. 2016). L'étude démontrait pour ce prototype un seuil de détection de l'hématurie pouvant descendre à 160 GR/ $\mu$ L (Figure 8).

##### **3.1.2 Robustesse**

Cette même étude (Khenifar, del Castillo et al. 2016) a montré une influence significative du pH et de la protéinurie sur le seuil de détection du prototype, avec une augmentation de ce seuil en cas d'augmentation du pH ou de la protéinurie (Figure 8).

Suite à ces résultats, notamment concernant le seuil de détection, jugé correct sur le prototype mais pas excellent, la compagnie qui produit les granules a modifié son système de séchage des granules, afin de perdre moins de réactifs. C'est ainsi que la « recette » du prototype final a été obtenue.

Figure 8. Présentation poster de l'étude en deux phases sur le prototype du produit



# Monitoring feline hematuria at home: assessment of a potential screening test

Université de Montréal

Khenifar E., Del Castillo JRE, Gara-Boivin C  
Université de Montréal, St-Hyacinthe, Canada

Intersand Health

**Key finding:** The tested litterbox screening pellets can detect feline hematuria at concentrations of 320 RBC/ $\mu$ L or lower, depending on urine composition.

### Introduction

**Background:** Detecting hematuria is a challenge for cat owners. A granular chromogenic screening test for the litterbox is being developed to detect hematuria.

### Objectives and hypothesis

The test can consistently detect clinically relevant microhematuria

- determine the hematuria lower limit of detection *in vitro*
- verify its robustness in altered urine composition

### Materials and methods

**In vitro:**

Fig.1: Test tube	Dilution rank	Concentration (RBC/ $\mu$ L)	Fig.2: Urine placed on 4 random pellets
	0 = stock	0	
	1	8.5 10 <sup>6</sup>	
	2	3.2 10 <sup>6</sup>	
	3	1.6 10 <sup>6</sup>	
	4	800	
	5	400	
	6	200	
	7	100	
	8	25	
	9	13	
	10	5	
	11	2	
	12	0	
	13 = blank	0	

Fig.3: Chromogenic urinary scale

**Ex vivo:**

- Greco-latin square (3 squares of 4 periods per 4 sequences)
- 6 male and 6 female cats
- 4 fluid therapies given awake (6 hours at 10 mL  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>  $\cdot$  hr<sup>-1</sup>):
  - A: NH<sub>4</sub>Cl
  - B: NH<sub>4</sub>Cl + NaCl 5%
  - C: NaHCO<sub>3</sub>
  - D: NaHCO<sub>3</sub> + NaCl 5%
- Spontaneous micturition collected on polypropylene beads litter, fortified with RBC as in Fig. 2, and color changes of pellets scored as in Fig. 3.
- Data analysis: ordinal multivariate logistic regression ( $\alpha = 0.05$ )

### Results

**In vitro:** lower limit of detection = 160 RBC/ $\mu$ L, equivalent to 15-20 RBC/high power field (x400) of the sediment from 5mL urine

Dilution Rank	0 = stock	1	2	3	4	5	6	7	13 = blank
Concentration (RBC/ $\mu$ L)	8.5 10 <sup>6</sup>	0.6 10 <sup>6</sup>	3.2 10 <sup>6</sup>	1.6 10 <sup>6</sup>	800	400	200	100	0
Microscopic observation (RBC/HPF)	>50	>50	>50	>50	>50	34-50	17-27	10-21	0
Chromogenic score	3+	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0

**Ex vivo:**

- The i.v. fluids changed the urinary SG, pH and proteins. The limit of detection increased with:
  - pH (320 RBC/ $\mu$ L with pH8.5)
  - proteinuria (640 RBC/ $\mu$ L with Prot $\geq$ 15 mg/dL)
- microhematuria still detected (graph 1 and 2)
- No significant effect ( $p > 0.05$ ) of SG (graph 3) or sex

### Discussion

**Necessity of this test:**

- Hematuria is a frequent sign in urinary tract diseases<sup>1</sup>, which are common among cats<sup>2</sup>.
- Relevance of the diagnosis of hematuria's origin<sup>3</sup> and relevance of an early diagnosis of urinary tract disease<sup>4</sup>

**Relevance of this detection limit:**

- The pellets detect as low as 15-20 RBC/high power field (x400)  $\rightarrow$  160 RBC/ $\mu$ L over the pathological limit and under the limit of macrohematuria (2500 RBC/ $\mu$ L)<sup>5</sup>

**Limits of this study:** *In vitro* and *ex vivo* controlled conditions. Currently under testing in clinics and households with feline patients at risk of hematuria.

### Conclusion

In both experiment, hematuria was detected in the range of microhematuria. The product has good potential for clinical use.

### Literature cited

- Dorsch, R., et al. (2014). "Feline lower urinary tract disease in a German cat population. A retrospective analysis of demographic data, causes and clinical signs." *Tierarztl. Prax. Ausg. Kleintiere Heimtiere* 42(4): 231-239.
- Bartlett, P. C., et al. (2010). "Disease surveillance and referral bias in the veterinary medical database." *Prev. Vet. Med.* 94(3-4): 264-271.
- Forrester, S. D. (2004). "Diagnostic approach to hematuria in dogs and cats." *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 34(4): 849-866.
- Grauer, G. F. (2005). "Early detection of renal damage and disease in dogs and cats." *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 35(3): 581-596.
- Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology Second Edition, 2008
- American Urological Association

### Acknowledgments

- Project funded in part by MITACS acceleration research grants

### For further information

elodie.khenifar@umontreal.ca

### Graph 1: Effects of urinary pH

Observed - pH < 6.5 - 6.5 - 8.5 - 8.5 -> 7.0 - 7.49  
- 7.5 - 7.99 - 8.0 - 8.5 -> pH > 8.5

### Graph 2: Effects of proteinuria

Observed - P - 0 mg/dL - P - 15 - P > 30

### Graph 3: Effects of SG

Observed -> 1.012 - 1.017  
- 1.018 - 1.024 -> 1.024

## **3.2 Etudes préliminaires sur le produit final**

### **3.2.1 Etude pilote**

L'étude pilote a été réalisée sur un prototype du produit par les Drs Gara-Boivin C. et del Castillo J.R.E., de l'Université de Montréal.

#### **3.2.1.1 Approbation de bioéthique**

Le protocole de l'étude pilote a été approuvé par le comité de bioéthique de l'Université de Montréal (13-RECH-1722).

Les propriétaires de tous les chats recrutés ont signé un formulaire de consentement éclairé joint au protocole de l'étude. Les cliniques participantes ont signé un accord de confidentialité.

#### **3.3.1.2 Résumé de la méthodologie de l'étude pilote**

L'étude pilote s'est déroulée dans une clinique vétérinaire privée à Montréal. Les membres de l'équipe vétérinaire ont recruté des chats hospitalisés admissibles sur une période de 3 mois.

Les critères d'inclusion étaient les suivants : chats stérilisés âgés de 0 à 10 ans, présentant une suspicion de maladie des voies urinaires ou une atteinte systémique non rénale, et hospitalisés pour une intervention chirurgicale sans atteinte des voies urinaires (par exemple, orthopédie, extraction dentaire). Les critères d'exclusion étaient : l'incontinence urinaire, avoir reçu une chimiothérapie anticancéreuse au cours des 7 jours précédents et/ou la présence de sang dans les selles.

Les chats éligibles recrutés utilisaient pendant leur hospitalisation une litière agglomérante à base d'argile, sur laquelle le produit de dépistage était dispersé. Si le produit de dépistage passait du blanc (négatif) au bleu (positif), la litière du chat était remplacée par une litière de billes de polypropylène (litière non-absorbante) pour collecter l'urine en vue d'une analyse de confirmation (comptage des GR au microscope et analyse chimique avec une bandelette).

#### **3.3.1.3 Informations apportées par l'étude pilote et améliorations nécessaires**



Au cours de cette étude pilote, plusieurs points ont été notés et ont permis d'améliorer le protocole final. Tout d'abord, il était très difficile de recueillir une miction spontanée chez ces chats hospitalisés : peu de chats ont finalement uriné sur la litière de bille non-absorbante. En outre, la tenue de registres pendant plusieurs jours pour différents animaux hospitalisés s'est avérée problématique pour la traçabilité des tests sur le produit.

Sur la base de ces résultats, des ajustements ont été apportés à l'étude principale : c'est ainsi qu'a été décidé de tester l'épreuve de dépistage en clinique (en une mesure et non sur plusieurs jours) ainsi qu'au domicile du propriétaire avec une confirmation le cas échéant via une collecte d'urine en clinique vétérinaire. L'utilisation d'une litière de bille, pouvant créer d'après ces résultats une aversion du chat pour la litière, n'était pas envisageable dans l'étude finale.

### **3.2.2 Publications préliminaires concernant le produit final**

#### **3.2.2.1 Seuil et robustesse**

Une étude ex-vivo similaire à celle réalisée sur le prototype a été réalisée sur le produit final. Il s'agit de la première partie l'étude de ce mémoire, développée §4 (détection du seuil), associée à la seconde partie de l'étude sur le prototype (étude de la robustesse, déjà présentée §3.1.2.). Les résultats ont été publiés sous forme de poster au congrès annuel de l'« International Society of Feline Medicine », à Sorrento, Italie, en juin 2018 (Khenifar, del Castillo et al. 2018). L'étude démontrait pour ce produit final un seuil de détection de l'hématurie pouvant descendre à 100 GR/ $\mu$ L (Figure 9) ; ainsi qu'une bonne robustesse du prototype du produit face aux altérations dans l'urine du chat.

Figure 9. Présentation poster de l'étude sur le seuil de détection du produit final et sur la robustesse du prototype du produit

## EX VIVO SENSITIVITY AND ROBUSTNESS OF A NOVEL HOME-SCREENING TEST FOR FELINE HEMATURIA

Khenifar E, del Castillo JRE, Gara-Boivin C  
Université de Montréal, St-Hyacinthe, Canada

**Key finding:** The lower limit of repeatable detection is 100 RBC/ $\mu$ L  $\leftrightarrow$  12 [8-16] RBC/HPF.  
The color remains stable at least for 48 hours.

### Introduction

**Background:** Hematuria is a frequent sign in feline urinary tract diseases<sup>1</sup>. Detecting hematuria is a challenge for cat owners. A novel hematuria-screening test for use at home on the litter has just completed its development.

### Objectives and hypothesis

**Hypothesis** The test can consistently detect clinically relevant microscopic hematuria

**Objectives**

- determine the hematuria lower limit of detection in vitro
- verify its robustness in altered urine composition

### Materials and methods

#### In vitro:



Table 1: Quadruplicate testing of 50  $\mu$ L of feline RBC-fortified pooled feline urine

- Granules chromogenic score readings performed at 3 and 30 minutes and at 24 and 48 hours after exposure to fortified urine
- In parallel, centrifugation of the urine samples and additional blood detections (dipstick of the supernatant and microscopy of the sediment)
- Protocol repeated on 4 pools of urine with different specific gravity (SG): 1.026, 1.037, 1.047 and 1.053 g/mL

#### Ex vivo:

- Greco-latin square (3 squares of 4 periods of 4 sequences)
- 6 male and 6 female cats
- 4 fluid therapies given awake (6 hours at 10 mL $\cdot$ kg<sup>-1</sup> $\cdot$ h<sup>-1</sup>), causing transient polyuria with differential effects on urinary composition:
  - A: NH<sub>4</sub>Cl
  - B: NH<sub>4</sub>Cl + NaCl 5%
  - C: NaHCO<sub>3</sub>
  - D: NaHCO<sub>3</sub> + NaCl 5%
- Spontaneous micturition collected on polypropylene beads litter, tested for pH, SG and proteinuria, and then fortified with RBC as in Fig. 2, and color changes of granules scored as in Fig. 3.
- Data analysis: generalized linear mixed model for ordinal repeated measures

### Results

#### In vitro:

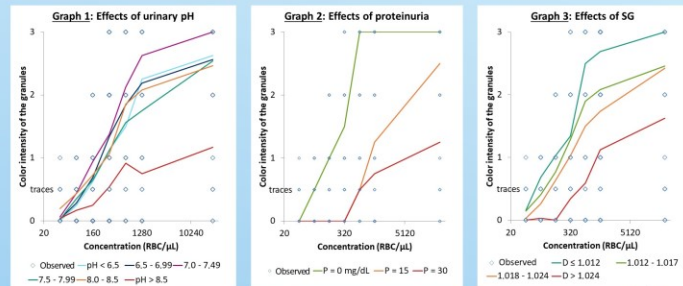
Microhematuria recorded at concentrations  $\leq$  1965 RBC/ $\mu$ L in this experiment  
Lower limit of detection: 100 RBC/ $\mu$ L  $\leftrightarrow$  12 [8-16] RBC/High Power Field (x400) at the microscopic examination of the sediment from 5 mL of urine

Dilution Rank	0 = stock	1	2	3	4	5	6	7	13 = blank
Concentration (RBC/ $\mu$ L)	8.5 $\cdot$ 10 <sup>6</sup>	0.6 $\cdot$ 10 <sup>6</sup>	32 $\cdot$ 10 <sup>3</sup>	1.6 $\cdot$ 10 <sup>3</sup>	800	400	200	100	0
Microscopic observation (RBC/HPF)	>50	>50	>50	>50	>50	34-50	17-27	10-21	0
Granules score 3 min	3+	3+	3+	3+	2+	2+	1+	1+	0
Granules score 30 min	3+	3+	3+	2+	2+	1+	1+	1+	0
Granules score 24h	3+	3+	3+	2+	2+	1+	1+	1+	0
Granules score 48h	3+	3+	3+	2+	2+	1+	1+	1+	0

Table 2: Positive chromogenic responses of the granules (at 48 hours) for the first dilution ranks with SG=1.026

#### Ex vivo:

- The I.V. fluids changed the urinary SG, pH and proteins. The limit of detection increased with:
  - pH (320 RBC/ $\mu$ L with pH $\geq$ 8.5)
  - proteinuria (640 RBC/ $\mu$ L with Prot $\geq$ 15 mg/dL) } microhematuria still detected (graph 1 and 2)
- No significant effect (p>0.05) of SG (graph 3) or sex



### Discussion

#### Necessity of this test:

- Hematuria is a frequent sign in urinary tract diseases<sup>1</sup>, which are common among cats<sup>2</sup>
- Relevance of the diagnosis of hematuria's origin<sup>3</sup> and relevance of an early diagnosis of urinary tract diseases<sup>4</sup>

#### Relevance of this detection limit:

- > 5 RBC/high power field (x400) is considered as pathologic<sup>5</sup>.
- The granules detect as low as 12 RBC/HPF (x400) $\leftrightarrow$ 100 RBC/ $\mu$ L, over the pathological limit and under the lower limit of macrohematuria (2500 RBC/ $\mu$ L)<sup>5</sup>.

- Limits of this study:** ex vivo controlled conditions. Currently presenting a test in clinics and households with feline patients at risk of hematuria.

### Conclusion

- In both experiment, hematuria was detected in the range of microhematuria. The product has good potential for clinical use.

### Literature cited

- Dorsch, R., et al. (2014). "Feline lower urinary tract disease in a German cat population. A retrospective analysis of demographic data, causes and clinical signs." *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere* 42(4): 231-239.
- Bartlett, P. C., et al. (2010). "Disease surveillance and referral bias in the veterinary medical database." *Prev Vet Med* 94(3-4): 264-271.
- Forrester, S. D. (2004). "Diagnostic approach to hematuria in dogs and cats." *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 34(4): 849-866.
- Grauer, G. F. (2005). "Early detection of renal damage and disease in dogs and cats." *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 35(3): 581-596.
- Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology Second Edition, 2008

### Acknowledgments

- Project funded in part by MITACS acceleration research grants

### For further information

elodie.khenifar@umontreal.ca

### **3.2.2.2 Etude multicentrique adaptative**

Enfin, une étude in-vivo avec une utilisation réelle du produit final en clinique et dans le milieu de vie des chats a été réalisée. Il s'agit de la deuxième partie de l'étude qui est développée §4 dans ce mémoire. Les résultats ont été publiés sous forme de poster à la fois au « World Veterinary Association Congress », à Barcelone, Espagne, en mai 2018 (Khenifar, del Castillo et al. 2018) et au congrès annuel de l'« International Society of Feline Medicine », à Sorrento, Italie, en juin 2018 (Khenifar, del Castillo et al. 2018).

Le poster dévoile les caractéristiques métriques de ce test de dépistage de l'hématurie, à savoir une sensibilité de 91.5%, une spécificité de 90.9%, et dans le bassin de population de l'étude, une valeur prédictive positive de 93.5% et une valeur prédictive négative de 88.2% (Figure 10).

Figure 10. Présentation poster de l'étude multicentrique adaptative sur la fiabilité du produit final

## RELIABILITY ASSESSMENT OF A NOVEL FELINE HEMATURIA HOME SCREENING TEST

Khenifar E, del Castillo JRE, Gara-Boivin C  
Université de Montréal, St-Hyacinthe, Canada

**Key finding:** The chromogenic screening test has the required metric characteristics for a reliable use in clinical monitoring of feline hematuria.

### Introduction

**Background:** Hematuria is a frequent sign in feline urinary tract diseases<sup>1</sup>. Detecting hematuria is a challenge for cat owners. A novel hematuria-screening test for use at home on the litter has just completed its development.

The product's sensitivity towards microhematuria and robustness to urine composition have been disclosed elsewhere<sup>2,3</sup>:

- Lower limit of detection: 100 red blood cells (RBC)/ $\mu$ L  $\leftrightarrow$  8-16 RBC/high power field (HPF)
- Color slightly decreased by urinary specific gravity, pH, and proteins but still detects microhematuria

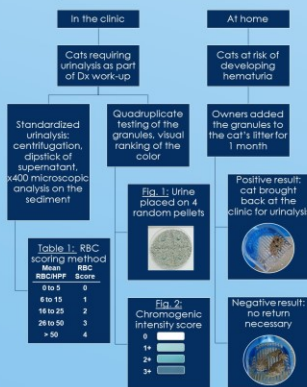
### Objectives and hypothesis

**Hypothesis** The metric characteristics of the product are adequate for the clinical monitoring of feline hematuria.

**Objectives** Assess the reliability of the screening test in the clinical setting and at home with cats afflicted by a variety of feline health problems.

### Materials and methods

- Multicentric adaptive clinical trial, comprising a planned interim statistical analysis to assess and/or revise the experimental plan, in 6 veterinary clinics of Quebec and one shelter.
- 2 study arms:

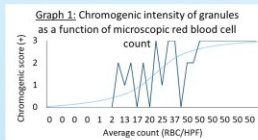


- Cystocentesis  $\rightarrow$  Initial hematuria positivity threshold of  $> 15$  RBC/HPF.
- The test sensitivity (Se), specificity (Sp), and positive and negative predictive values (PPV, NPV) were determined at each level of the color scale.
- The test's response modifiers were assessed with a generalized linear mixed model for ordinal response variables ( $\alpha = 0.05$ ).

### Results

#### Interim statistical analysis:

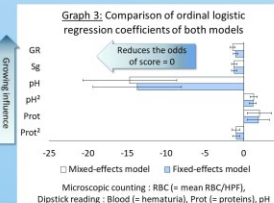
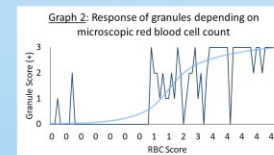
Performed on the first 34 cats (4 clinics)



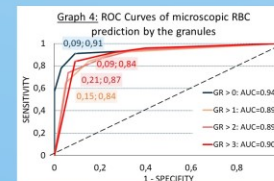
Sigmoid positive correlation between granules score and RBC count (Graph 1). Hematuria threshold was too conservative and could be decreased back to 5 RBC/HPF. The 2<sup>nd</sup> study arm is underrepresented  $\rightarrow$  Recruitment of a cat shelter. To detect at least one false negative and false positive and perform the final statistical analysis, 80 cases are required.

#### Final statistical analysis:

Performed on the data of 80 cats: 69 in the 1<sup>st</sup> arm, plus 11 in the 2<sup>nd</sup> arm.



- Number of RBC/HPF, blood, proteinuria and pH significantly increased cumulative odds of positive screening result ( $p < 0.05$ ). (Graph 2,3)
- The quadratic effects of pH (Graph 3) and proteinuria (not shown) slightly decreased the color intensity of a positive result ( $p < 0.05$ ).



- For a positive result of  $\geq 1+$ , Se=91.5%, Sp=90.9%, PPV=93.5% and NPV=88.2%.

### Discussion

#### Response modifiers of the test:

Blood on dipstick: hemolysis that cannot be detected with microscopy  
pH: quadratic effect

Optimal reaction pH  $\approx 7$   
Hindrance at alkaline pH

Proteins: quadratic effect  
Higher urinary protein values likely related to albuminuria

#### Relevance of this detection limit:

$> 5$  RBC/high power field ( $\times 400$ ) is considered as pathologic<sup>4</sup>. The pellets detect as low as 12 RBC/HPF ( $\times 400$ )  $\leftrightarrow$  100 RBC/ $\mu$ L, over the pathological limit and under the lower limit of macrohematuria (2500 RBC/ $\mu$ L)<sup>5</sup>.

#### Variation Factors

	Suspected hemolysis	pH $\geq 8$	UD $> 1,060$	Unexplained
Total False Positives = 3/46	2			1
Total False Negatives = 4/34		3	1	0
				Total unexplained=1

#### Limits of this study

- Hemolysis and "false positive"
- Proteinuria measured with strips and not protein-to-creatinine ratio

### Conclusion

- The chromogenic screening product has the required metric characteristics for a reliable use in clinical monitoring of feline hematuria. Further studies are under progress to confirm the test reliability on a wider sample of patients and document the prevalence of hematuria among the North American feline population.

### Literature cited

- Dorsch, R., et al. (2014). "Feline lower urinary tract disease in a German cat population. A retrospective analysis of demographic data, causes and clinical signs." *Tierarztl. Prax. Ausg. K. Kleintiere Heimtiere* 42(4): 231-239.
- Khenifar E. et al., 2016, *ACVP Annual meeting*, New Orleans, LA, U.S.A.
- Gara-Boivin C. et al., 2018, *WVAC Annual meeting*, Barcelona, Spain
- Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology Second Edition, 2008
- American Urological Association

### For further information

elodie.khenifar@umontreal.ca

## 4. ARTICLE

Article en cours de soumission au JAVMA, mars 2019.

### 4.1 Title: Reliability assessment of a novel home-screening test for feline hematuria

Authors: E. Khenifar, J.R.E. del Castillo, C. Gara-Boivin. Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada.

### 4.2 Abstract

*Background:* Despite the health benefits of its early diagnosis, detecting hematuria is challenging for cat owners. A novel at-home hematuria-screening test, on the litter, has been developed. We hypothesized that the metric characteristics of the product are adequate for the clinical monitoring of feline hematuria. The goal of this two-phase study was to assess the reliability of the test.

*Methods:* Phase 1 consisted of the evaluation of the detection threshold using pooled feline urine with variable urine specific gravities (Sg), enriched with feline red blood cells (RBC). Phase 2 was a multicentric adaptive clinical trial, comprising a planned interim statistical analysis, using two study arms. In the first arm, six Canadian veterinary clinics tested the product on every cat requiring urinalysis, ranking color intensity of the granules from 0 (negative) to 3+ (dark blue). In the second arm, owners of cats with urinary issues used the test for 1 month and brought the cat for urinalysis in case of a positive result. Initially, hematuria was considered present at >15 RBC/high power field (HPF). The test sensitivity (Se), specificity (Sp), and positive and negative predictive values (PPV, NPV) were determined and its response modifiers were assessed with a generalized linear mixed model for ordinal response variables ( $\alpha=0.05$ ).

*Results:* In phase 1, the lower detection threshold was 100 RBC/ $\mu$ L (Sg=1.026). In phase 2, interim statistical analysis revealed that the test hematuria threshold needed to be reduced to 5 RBC/HPF and that 80 total cases were required. For a positive result of 1+ or higher, Se=91.5%, Sp=90.9%, PPV=93.5% and NPV=88.2%. Number of RBC/HPF, blood estimation from the dipstick, proteinuria, pH and quadratic effects of proteinuria and of pH significantly impacted the granules color intensity ( $p<0.05$ ).

*Conclusion:* The chromogenic screening product has the required metric characteristics for a reliable use in clinical monitoring of feline hematuria.

**Keywords:**

Hematuria

Cats

Direct-To-Consumer Screening and Testing

Feline disease

Urinary tract diseases

Adaptive Clinical Trial Design

### 4.3 Introduction

Hematuria, i.e. the presence of blood in urine, is frequently associated with feline lower urinary tract disorders (FLUTD) such as feline idiopathic cystitis (FIC), uroliths and urinary tract infections (UTI). For instance, a retrospective study of FLUTD cases presented to a German University's small animal clinic reported that microscopically detectable hematuria was present in 128 of 302 recorded cases (91%) (Dorsch, Remer et al. 2014).

Yet detecting hematuria, even in the range of macrohematuria, is difficult for the owner: whether inside or outside the litterbox, owners detect hematuria mostly when the cat urinates on a clear surface that provides sufficient color contrast to evidence the presence of blood. In the above-mentioned retrospective study, the owners observed hematuria prior to presentation to the clinic in only 128 cases (42%), thus missing half of the hematuric individuals (Dorsch, Remer et al. 2014). Cat owners more readily notice behavioral changes in the cat, such as periuria (Hostutler, Chew et al. 2005), dysuria, stranguria and pollakiuria. Those signs generally appear in a more advanced stage of the underlying condition and are not always considered as a motive for a veterinarian consultation by the owners. According to a privately sponsored survey (Groupe Intersand Canada, internal data 2015), only 5 to 10% of cat owners tend to make an appointment with the veterinarian immediately after finding periuria, and 75% wait for it to be "intolerable". Considering that FIC, a medical issue, is present for half of the cats which the only clinical sign noticed by the owner is periuria (Buffington, Chew et al. 1997), a potential lack of knowledge of the medical causes of periuria to the benefit of behavioral housesoiling issues could be underlined.

Being both a biomarker of common, potentially harmful feline illnesses, and the source of loss of several endogenous substances, including red blood cells (RBC), and serum proteins (e.g. albumin) that undermine the natural resistance and well-being of the cat, the development of an efficient, easy-to-use screening test that increases the detection rate of feline hematuria at home would be an asset.

Currently, besides the studied product, there are no available products on the market that allow an easy, non-invasive, reliable monitoring of microscopic hematuria.

In the past, a screening product (e.g. powder additive to cat litter) for the detection of hematuria in the household was available (Hemalert®, by Ralston Purina Company), but to our knowledge it is no longer commercialized.

The studied test is a new screening product, Blücare® (by Blücare Lab Inc, Boucherville, Québec), that consists of small hygroscopic granules impregnated with tetramethylbenzidine (TMB), a colorless substance that turns blue-green after hemoglobin uses it as an electron acceptor in the catalytic reduction of a peroxide. Previous studies have been made on the prototype of the product. The analytical sensitivity of the product prototypes and robustness to urine composition were determined under *ex vivo* conditions, i.e. with feline urine fortified at increasing concentrations of feline RBC. Briefly, its lower limit of reproducible detection was 160 RBC/ $\mu$ L, a concentration that does not visibly alter the color and turbidity of urine (i.e. microscopic hematuria) (Khenifar, Del Castillo et al. 2006). In the subsequent *ex vivo* assessment of the prototype's robustness to chemical composition of feline urine, the color intensity of the chromogenic reaction was slightly but significantly ( $p \leq 0.02$ ) decreased at urine pH values higher or equal to 8.5 or with increasing urine protein concentration. However, these factors did not affect the ability of the screening product to detect feline microscopic hematuria.

The goal of the current study was to complete a reliability assessment of this product by testing its screening performance with diseased cats at risk of hematuria. We hypothesized that with the above-described analytical sensitivity and robustness, the screening device would possess the required metric characteristics (sensitivity and specificity) for a reliable use at home and in the clinical setting. The objective of this study was to determine the positive predictive value and the negative predictive value of this test.

## **4.4 Materials and Methods**

### **4.4.1 Bioethic approval**

The study protocol was approved by the University of Montreal bioethics committee (16-RECH-1722). Owners of all recruited cats signed an informed consent form attached to the study protocol. Participating clinics signed a non-disclosure agreement.



## **4.4.2 Phase 1: screening threshold determination**

### **4.4.2.1 Red blood cells sampling**

A 3mL sample of feline blood was collected by jugular venipuncture into an EDTA tube. The blood was centrifuged, followed by separation of red blood cells and plasma. No hemolysis was apparent in the serum. Plasma was removed and the red cell pellet was resuspended with 1mL of sterile physiological saline (0.9% NaCl) in the original tube. A count of red blood cells was then performed using the ADVIA 120 to determine the amount of red blood cells in this tube (so-called "stock" solution).

### **4.4.2.2 Urine sampling**

From the stock solution, 13 dilutions with pooled cat urine were performed. Urine inclusion criteria for pooling were: urine specific gravity (Sg) $>1.035$ , pH $<8$ , and an inactive urinary sediment (centrifugation pellet of 5mL urine  $<5$  red blood cells / 400x field). The final Sg of the pooled urine was 1,047g/mL. It was fortified ex vivo with feline RBC at 13 different concentrations ranging between 0 and 640000 RBC/ $\mu$ L according to the protocol (Table 1). This protocol was repeated on 3 other pools of urine with various Sg (respectively 1.037, 1.026, and 1.053 g/mL). For each pool, a standard urinalysis procedure was performed to check the urine characteristics: urine was centrifuged for 5 minutes at 3300 revolutions/minute (962g), Sg was then read with a refractometer, urine chemistry was performed on the supernatant with a urine test strip (Chemstrip 9, Roche Diagnostics, USA) and the urine sediment was analyzed via microscopy at 100x low power field and then 400x high power field (HPF). Each pool had pH=6, turbidity=0, proteinuria=1mg/dL. The purpose of the dilutions was to decrease the amount of red blood cells, with many dilutions at lower levels of red blood cells, to determine the hematuria screening limit of the screening granules. Dilutions included a control with 0 red blood cells (dilution 13).

### **4.4.2.3 Product testing**

The product was tested in quadruplicate by pouring 50  $\mu$ L of the 13 different concentrations of the RBC fortified pooled feline urine (1.047 g/mL Sg) on granules deposited on a petri dish containing a standardized litter (OdourLock® by Groupe Intersand Inc Canada). Granule readings were performed at 3 and 30 minutes, and at

24 and 48h after exposure to fortified urine. In parallel, the urine samples were centrifuged and subjected to additional blood detection, including dipstick of the supernatant and microscopy of the sediment. This protocol was repeated on 3 other pools of urine (respectively 1.037, 1.026, and 1.053 g/mL).

Color intensity of the chromogenic reaction was scored with an ordinal scale from 0 (none) to 3+ (strong), as in Figure 1.

### **4.4.3 Phase 2: Multicentric adaptive clinical trial**

#### **4.4.3.1 Main study design**

##### *Multicentric adaptive clinical trial design*

Since the actual incidence of feline hematuria is unknown both in Canadian households and in Canadian veterinary clinics, a multicentric adaptive clinical trial with two study arms was conducted, arm#1 at the clinic with relevant incoming cases and arm#2 at the homes of cats followed for a diagnosed risk of hematuria. Adaptive clinical trials are distinguished from other types of clinical trials in that they comprise one or more planned (i.e. decided a priori) interim data analysis that occur during the course of the data collection period. This allows modifying the initial trial design to improve its ability to verify the tested hypothesis, terminating the study because no more subjects are required to reject the null hypothesis, or terminating the trial because the tested intervention is ineffective. This approach allows greater experimental flexibility (Kairalla, Coffey et al. 2012, Bretz, Gallo et al. 2017). In this study, one interim data analysis was planned.

##### *Clinic recruitment*

An advertisement for the study was published for veterinarians on pages dedicated to feline health, on social networks. The clinics that completed a survey about their approximate number of urinalyses per week, the presence of cats with chronic urinary disorders, their method(s) of urinary collection, their urinalysis protocol, their hours of operation and their motivation for the study. The 4 eligible clinics (i.e. with a large population of cats with urinary disease, a high number of urinalyses, a similar protocol

to standard urinalysis protocols and high motivation) were selected in southern Quebec (from Gatineau to Drummondville).

Prior to commencing the study, a training session was performed with veterinarians and technicians at each participating clinic. The aim of these sessions was to standardize the urinalysis procedures. Furthermore, the multicentricity of the study was chosen to dilute any operator dependent variable.

#### **4.4.3.2 First arm, in clinic laboratory urinalysis**

##### *Case selection*

In the first study arm, the participating clinics enrolled all the incoming cats with a suspected health problem for which a urinalysis was deemed necessary as part of the diagnostic procedures. They incorporated the evaluation of the hematuria testing device in their routine analysis.

##### *Urine collection*

The participating veterinarians or technicians collected a minimum of 5mL of urine from each eligible cat. All methods of collection, including cystocentesis, forced or spontaneous micturition, were accepted. The method of collection was specified on the animal record.

##### *Urinalysis procedures*

The screening test product was added to the standard protocol of urinalysis. The urine sample was homogenized, and then 2 drops were poured on each of 4 granules of the tested product (laying on a standardized layer of litter in an inert polystyrene dish). The urine was then centrifuged for 5 minutes around 3300 revolutions/minute (=962g), Sg was read with a refractometer, urine chemistry was performed on the supernatant with a urine test strip (Chemstrip 9, Roche Diagnostics, USA) and the urine sediment was analyzed via microscopy at 100x low power field and 400x high power field. The reading of the tested screening product occurred approximately 3 minutes after placing the urine drops, using a printed chromogenic intensity scale. The results ranged from 0=no change in color to 3+=dark blue (Figure 1). This ordinal scaling was additionally

recoded into a binary variable (i.e. 0, 1) for further analyses, where all positive reaction scores were pooled together into the same response category (1).

Participating veterinary clinics were required to fill a standard form with the following urinalysis information: patient, name of the owner, name of the cat, breed, age, gender, neutering status, method of collection (cystocentesis, compression-induced or spontaneous micturition), physical characteristics of the urine (turbidity from 0 to 3+ and color: yellow, amber or red), reaction to the chromogenic agent (from 0 to 3+), Sg (from 1 to Sg > 1.050), urine test strip result (including blood from 0 to 4+, proteins from 0 to 3+), and microscopy findings (mean number of RBC per 400x HPF, over 10 fields) and other elements noted on the sediment microscopic examination.

#### **4.4.3.3 Second arm, in the household of cats followed for a diagnosed risk of hematuria with laboratory follow-up**

##### *Case selection*

The participating clinics enrolled all cats at risk of developing hematuria according to the treating veterinarian, such as cats with a recent diagnosis of urolithiasis or a history of idiopathic cystitis; in light of the potential reoccurrence of those pathologies. Hematochezia was the only exclusion criterion. The owner's signed consent was obtained for this study arm.

##### *Protocol for the second arm data collection*

Owners of at-risk cats were given a one-month supply of the screening test (4 packs of 15g of granules of the chromogenic agent) and 1 bag of 12kg of a standardized high-quality clumping litter. For one month, owners were instructed to pick the litter clumps daily to verify the color of the granules trapped in the clumps and to change the whole litter containing one bag of granules every week. If a change in color of the granules was observed (blue color), owners were asked to bring the cat back to the veterinary clinic for a confirmation urinalysis within 48 hours, however cases presented until 4 days after of observing a color change at home were accepted. Urinalysis data collection was identical to the first arm collection, with a test of the granules as previously described. The response of the chromogenic test considered in the final statistical analysis was the observed color at the veterinarian clinic during follow-up.

This was done in order to diminish the occurrence of a change in the status (hematuric cats becoming non hematuric within the 4 days follow up and vice versa) as well as to standardize the evaluation conditions when scoring the response of the granules (petri dishes, trained assessors).

If no hematuria was observed on the urine sediment during follow-up at the veterinary clinic, the consultation and urinalysis fees were refunded by the researchers to the owner.

#### *Urine collection method on the cats that triggered the chromogenic reaction at home*

The method of collection was the same as for arm #1. The clinic had to precise which method of collection was chosen (cystocentesis, taxis or spontaneous micturition).

#### **4.4.3.4 Fixed hematuria threshold**

The physiologic limit of red blood cells in urine is 5-10 RBC/HPF (Stockham and Scott 2008, Tilley and Smith 2011). Because scientific literature revealed that cystocentesis typically produced some red blood cells in the urinary sediment upon microscopic examination of normal cats (Chew and DiBartola 2004), pathologic hematuria was initially considered present with a microscopic finding of more than 15 RBC/HPF when examining the sediment of 5mL urine. The severity of hematuria was determined with the following ordinal scale from 0 to 4+: 0, 0-5 RBC/HPF; 1+, 6-15 RBC/HPF; 2+, 16-25 RBC/HPF; 3+, 26-49 RBC/HPF; and 4+:  $\geq 50$  RBC/HPF.

The response of the chromogenic agent (Granules Score) is reflected by a new variable, calculated by the average of the response on the color scale of the 4 granules per test, rounded to the nearest integer (or the higher in case of a tie). When the specific gravity was too high to be measured by the refractometer ( $Sg > 1.050$ ), it was fixed at 1.060 for the calculations.

The variables reflecting the reading of hematuria, proteinuria and urinary pH on the dipstick are respectively called Dipstick Blood, Dipstick Proteinuria and pH.

#### **4.4.4 Statistical analysis**

The test sensitivity (Se), specificity (Sp), and positive and negative predictive values (PPV, NPV) were determined at each level of the color scale by means of a receiver operating characteristic (ROC) curves. The ROC Curves show the sensitivity of the test vs the anti-specificity and allows the measure of the area under the curve (AUC) corresponding to the capacity of a screening test to correctly classify a sample.

Two generalized linear models for ordinal response variables ( $\alpha=0.05$ ) were created especially for the study, assessing the effects of the response modifiers on the answer of the test. The proportionality of scores assumption was firstly verified, and the two response variables were Granules Score (the response of the test product) and RBC Score (the variable considered as gold standard).

First, a fixed-factor model was made, with the co-variables Dipstick Blood, Dipstick Proteinuria, Sg, pH, Method of collection, Color. The response variables were Granules Score and RBC Score, and the co-variables RBC Score and Granules Score were used as co-variables respectively for each other.

From this fixed factor model, a mixed model with the similar fixed factors to which random factors (cat group 1 or 2, site) are added was created to better investigate the effect of the random factors on the fixed factors, in order to better determine the effects of the fixed factors on the response variables.

### **4.5 Results**

#### **4.5.1 Phase 1: screening threshold determination**

We recorded microhematuria at concentrations  $\leq 1965$  RBC/ $\mu$ L, an amber coloration at concentrations  $\leq 39300$  RBC/ $\mu$ L and the appearance of a real red coloration at concentrations  $> 39300$  RBC/ $\mu$ L.

The lower limits of repeatable detection (1+ response recorded between 3 minutes and 48 hours) for the different Sg were 100 RBC/ $\mu$ L (with urine at 1.026 g/mL Sg), 246 RBC/ $\mu$ L (at 1.037 g/mL Sg), 665 RBC/ $\mu$ L (at 1.047 g/mL Sg) and 851 RBC/ $\mu$ L (at 1.053 g/mL). With a reading at 3 minutes, the lower limits of repeatable detection (1+

response on the color scale) were 50, 123, 332 and 426 RBC/ $\mu$ L respectively for 1.026, 1.037, 1.047 and 1.053 g/mL Sg, but the color intensity slightly decreased between 3 and 30 min and after that remained stable up to 48 hours.

For the pooled feline urine at Sg=1.026, pH=6, proteinuria=0.3mg/dL, the different coloration stages are detailed Figure 2 and an approximative correspondence between RBC/ $\mu$ L and RCB/HPF is established Figure 3.

#### **4.5.2 Interim statistical analysis**

The interim statistical analysis was made after recruiting 4 clinics and 34 cats in total from the first arm.

At this stage, 5 cases were selected in the second arm; 4 owners did not come back for consultation and one came back for urinalysis following a chromogenic positive response of the granules in the litter box 5 days after the color change so the case was rejected from the selection.

A strong correlation between RBC Score and the response of the chromogenic agent was present, showing good robustness of the test. The 15 RBC/HPF positive threshold was, however, overly conservative: the expected iatrogenic hematuria induced by cystocentesis or manual compression didn't appear to be present (there was no significant difference between the methods of urine collection) and the tested granules were more efficient than expected (the detection limit was lower than during the in vitro test).

As a consequence of the robustness of the test, few false negatives and an absence of false positives were present, due to the low number of cats returning in study arm #2. It was necessary to enrich the study with "status modifiers" in order to realize the final statistical analysis. Furthermore, more cases were deemed necessary, especially in the second arm of the study.

#### **4.5.3 Study protocol amendments following the interim analysis**

Following the interim analysis, the threshold indicating a hematuric cat was set at 5 RBC/400x HPF. A cat with a microscopic finding  $\leq 5$  RBC/HPF was considered non-hematuric, and inversely at  $> 5$  RBC/HPF was considered hematuric.

Furthermore, an additional clinic and an animal shelter serviced by another veterinary clinic were recruited in order to increase the number of patients in the second arm. The animal shelter housed several cats suffering from urinary pathologies, with a large pool of potential candidates fitting the criteria of the study. The shelter followed the same protocol as the owners recruited by the other 5 clinics. The final adaptation to the main protocol was directed towards the removal of the litter clumps, in order to better represent the average management of the litter box in a household. The litter clumps were removed every 2 days instead of daily, for all participants of the second arm. All other protocol features and sampling analysis procedures remained unchanged.

#### **4.5.4 Final results**

In total, 80 cats were recruited in the study: 69 in the first arm and 11 in the second arm. Of the 69 cats in study arm #1, 62 were presented spontaneously to the vet clinic. 7 cats were censored from study arm #2 because of non-compliance with the delay in presenting the cat after a positive granule reaction (i.e. > 4 days after) and their results were transferred to arm #1. Excluding the 7 cats that were transferred, 21 cats were eligible in total in the study arm #2, but only 11 were selected: two cats never started the study (one shelter cat was adopted, and one privately owned cat was euthanized), 8 had negative screening results (i.e. color=0) for the entire follow-up month and did not come back to the clinic for a urinalysis. Of the 11 cats remaining in the study arm #2, 9 cats had a positive response of the granules, and 2 had a negative response but the owner came back within 4 days for a urinalysis for another reason, hence the results were included).

The urinary variable measured by veterinarians on the day of the urinalysis for the 80 cats are presented in Table 2. Considering the hematuria threshold of > 5 RBC/HPF, 47/80 (58.8%) were hematuric and 33/80 (41.3%) were non hematuric (Figure 4). Among the hematuric cats, when considering the screening test as binary result with a cut off at 1+, the test was positive (Granule score  $\geq 1$ ) for 43 cats (91.5%) and negative for 4 cats (8.5%). Among the non hematuric cats, the screening test was negative (Granules Score=0) for 31 cats (93.9%) and positive for 2 cats (6.0%).



Dipstick Blood readings among the 80 cats were 0 (=negative) for 22 cats (27.5%), 1+ (5 to 10 RBC/ $\mu$ L) for 8 cats (10%), 2+ (25 RBC/ $\mu$ L) for 6 cats (7.5%), 3+ (50 RBC/ $\mu$ L) for 8 cats (10%) and 4+ (>250RBC/ $\mu$ L) for 36 cats (45%) (Table 3).

With the estimated conversion between RBC/ $\mu$ L and RBC/HPF (Figure 3), around 33 RBC/ $\mu$ L is equivalent to 5 RBC/HPF, thus the limit for the dipstick classification between a non-hematuric and an hematuric cat would be between 2+ and 3+.

Specific gravity for the 80 cats was between 1.004 and more than 1.080. (Sg was not always measurable precisely for values > 1.050). The mean and median values were 1.044 and 1.047 respectively.

The pH measurement for the 80 cats ranged between 5 and 9. The mean was 6.29 and the median 6.

Dipstick Proteinuria readings among the 80 cats were 0 (negative) for 9 cats (11.3%), 1+ (0.3 mg/dL) for 51 cats (63.8%), 2+ (1 mg/dL) for 6 cats (7.5%) and 3+ (5 mg/dL) for 14 cats (17.5%).

Turbidity of the urine was omitted for 1 cat. Among the 79 others, turbidity was 0 for 51 cats (64.6%), 1+ for 8 cats (10.1%), 2+ for 10 cats (12.7%) and 3+ for 10 cats (12.7%).

The test sensitivity (Se), specificity (Sp), positive and negative predictive values (PPV, NPV) and reliability were determined at each level of the color scale (Figure 5) by means of ROC Curves. When considering the test positive for a Granule Score  $\geq 1$ , the screening test showed a 91.5% Se (95% CI: 79.6 - 97.7%), 90.9% Sp (95% CI: 75.7 - 98.1%), 93.5% PPV (95% CI: 82.1 - 98.6%) and 88.2% (95% CI: 72.6 - 96.7%) NPV.

In the same way, considering the Dipstick Blood reading as a binary variable (as mentioned before, negative for a 0, 1+, 2+ reading and positive for a 3+, 4+ reading), a correspondence between the dipstick and the microscopic examination can be created (Table 4) and in this study, with this population of cats and this protocol, the blood marker of the dipstick showed a 89.4% Se, 94.0% Sp, 95.5% PPV and 86.1% NPV. The effects on the Granules Score of several variables were evaluated thanks to two generalized linear models for ordinal response variables ( $\alpha=0.05$ ): a fixed-factor model and a mixed-factor model. In both models for the response variable Granules Score,

RBC Score, Dipstick Blood, Dipstick Proteinuria and pH significantly increased the cumulative odds of a positive screening result ( $p < 0.05$ ) (Figure 6). However, the quadratic effects of proteinuria and of pH slightly decreased the color intensity of the response of the granules ( $p < 0.05$ ).

## 4.6 Discussion

This study was able to determine the lower limit of detection of the tested product (100 RBC/ $\mu$ L or 12 RBC/HPF) and used an adaptive multicentric clinical trial to determine its sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value (respectively 91.5, 90.9, 93.5 and 88.2%). Our results show that the chromogenic screening product has the required metric characteristics for a reliable use in clinical monitoring of feline hematuria.

The time limit chosen for the lower limit of repeatable detection in the phase 1 was 48 hours, to correspond with the utilization recommendations of the product (checking the coloration of the granules every 1-2 days). It was noted that difference between an observation at 3 min or at 48 hours was light,  $\leq 1$  dilution rank (between 50 and 425 RBC/ $\mu$ L depending of the Sg).

This study was the first veterinary study to use a multicentric adaptive protocol. Using an adaptive protocol with an interim statistical analysis made the statistical analysis and the protocol in this study complex, however the interim analysis provided useful information: the new defined threshold of 5 RBC/HPF instead of 15 RBC/HPF was more adequate as a detection limit for relevant hematuria, which is in accordance with the previously mentioned limits in the veterinary scientific literature (Reine and Langston 2005, Bailiff, Westropp et al. 2008, Kruger, Lulich et al. 2015, Reppas and Foster 2016). Indeed, the urinary threshold of  $> 5$  RBCs/HPF to declare a cat as hematuric was fixed after taking into account the threshold of 3 RBCs/HPF used in human medicine (Loo, Whittaker et al. 2009) and the 5-10 RBCs/HPF usually admitted in veterinary medicine (Forrester 2004, Stockham and Scott 2008). The lower limit in veterinary literature was chosen as 5 RBCs/HPF, because it seems that the 10 RBCs/HPF aimed to consider the effect of an invasive sampling method (cystocentesis, catheter, etc.), which was shown not to be significant in this study.

Furthermore, this interim analysis showed an absence of false positive cases, which were necessary for a reliable statistical analysis. The second arm of the study, created to reveal eventual positive status modifiers, had to be enriched after interim analysis. Therefore, a rescue shelter was recruited, providing more cats in the second arm. Moreover, an adaptation to the protocol was made that allowed a larger freedom for the owners and/or the animal technicians of the shelter: even if the protocol written on the packaging of the granules recommended a daily withdrawal of the clumps, this rarely occurs in the home of clients. The change in the protocol, permitting a longer period between clump removal (2 days), and seemed more adapted to reality.

The goal of the study was essentially to determine eventual status modifiers and thus the change in the protocol could seem paradoxical, as it voluntarily increased the risk of having false positives by increasing the number of cases in the arm that was supposed to bring in true and false positives. With this adaptation, there may have in fact been an overestimation of false positives (2/80) in this study group as compared to the actual use of this tested product. Further studies have shown that actual usage of the test product with a higher number of cats, produce superior results than observed throughout this study.

Following interim statistical analysis, 80 cats in total were recruited, a number considered high enough to assure good reliability for the final statistical analysis. Additional cats would have benefited the study, however recruitment in the second arm proved to be somewhat difficult due in part to owner compliance.

Follow-up with the clinics during the collection of the results showed that the measurements of the different urinary variables (microscopic RBC count, the dipstick results, the measurement of the urine specific gravity, etc.) were correctly made by the veterinarian clinics according to the training they had on the first day of their participation to the study, with the exception of the evaluations of the color and the turbidity of the urine. A dark yellowed urine seemed to be considered as “amber”; and the standardization of the turbidity measurement wasn’t respected. Therefore, in the statistical analysis, a new variable regrouping “yellow” and “amber” was created and the turbidity could not be considered.

There is a paucity in raw data on feline urinalysis in the literature, however the urinary variables recorded in this study seem compatible with previously published data (Stockham and Scott 2008, Lund, Krontveit et al. 2013).

According to the ROC Curves, the recommended cut off point would be a 1+ coloration of the granules, corresponding the hematuric versus non hematuric threshold of  $> 5$  RBC/HPF at the microscopic examination, with the Granules Score at 0 for  $\leq 5$  RBC/HPF and at 1+, 2+ or 3+ for  $> 5$  RBC/HPF. This curve demonstrates the highest Area Under the Curve (0.941), with the highest peak in the upper left corner, the best PPV (0.93) and a good NPV (0.88). This cut off point allows the best reliability of the product and, furthermore, is the most compatible with the relevant limit of feline hematuria detection.

As a comparison, an estimation of the metric characteristics of the Dipstick Blood reading was made, with this same population of cats and this protocol. For a positive result of 3+ and 4+ or higher, the blood marker of the dipstick showed an 89.4% Se, 94.0% Sp, 95.5% PPV and 86.1% NPV. This is similar to the metric characteristics of the studied granules. Dipstick Blood reading is considered as equivalent (Matulewicz, DeLancey et al. 2017) if not better than microscopic examination (Bataille, Wetzstein et al. 2016) in some human medicine research, indicating that the protocol used in this study provided greater susceptibility to possible status modifiers than its actual usage.

Concerning the status modifiers, the number of false positives were 2/33 and the number of false negatives were 4/47. The false negatives corresponded to the criteria of negative status modifiers (Figure 6): For all four false negative cases, a  $\text{pH} \geq 8$  or a urine specific gravity  $\geq 1.050$  were noted, which were included in the model as factors responsible for a decrease in the reactivity of the granules. It is indeed known that pH can have a significant influence on ion-exchanger chemical reactions (Chen, Yun et al. 2019). The reason of the influence of urine specific gravity remains unknown; we suspect that some soluble proteins may be responsible in forming a barrier between hemoglobin and TMB on the granules. No positive status modifiers were discovered in the model: all the factors having a positive effect on the reactivity of the granules could indeed be explained by the presence of the urinary red blood cells themselves (red blood cells count, dipstick measure of blood and proteinuria, a medium increase in the pH). The 2 false positive cases could have been misclassified from “true

positive” to “false positive” because of a limitation of the study: the reference for true positive classification was the urinary sediment microscopic examination, which is not reliable in cases of urinary erythrolysis. The lysis of erythrocytes can occur in urine with  $Sg < 1.015$  (Stockham and Scott 2008), which occurred for one of the “false positives” in which the  $Sg$  was  $1.010 < 1.015$ . Furthermore, for this case, blood was detected in the range of 2+ by the dipstick, and 1 to 3 RBC were counted during the microscopic examination, which could indicate the presence of potential free hemoglobin in the urine (Bataille, Wetzstein et al. 2016). Concerning the second case classified as a false positive, this cat was FIV+ and presented a middle bacteriuria, which could be responsible for a positive status modification. On the other hand, 3+ was also detected on the dipstick measurement for blood and 1 to 2 RBC were counted during the microscopic examination. Those may also be clues indicating the presence of potential free hemoglobin in the urine after an erythrolysis (Bataille, Wetzstein et al. 2016). Therefore, this study might have underestimated the specificity and the positive predictive value of the granules. This hypothesis could be supported by the fact that, with our method, even the dipstick metric characteristics seem underestimated in comparison with other studies (Moore and Robinson 1988, Matulewicz, DeLancey et al. 2017).

By compiling the analysis of the false negatives/false positives and the logistic ordinal regression coefficients of the statistical models on the Granule Score, this study allowed the determination of several negative status modifiers: a high pH ( $pH \geq 8$ ), and a high specific gravity ( $Sg > 1.050$ ) are deleterious to the chromogenic reaction of the granules and could be responsible for cases of false negatives. These modifiers have been communicated to the industrial partner and are included as part of the instructions of usage of the screening product (Blücare Lab 2019).

This study has some limitations. The measurement of proteinuria by dipstick instead of a protein-to-creatinine is a limitation in the quantification of the proteinuria, as the protein-to-creatinine ratio is more specific than the dipstick. However, the protocol had to be easily included in the urinalysis of the participating veterinary clinics, who did not readily have access to urinary protein-to-creatinine ratios, as this is commonly a referred laboratory test. Another perceived limitation could be the use of 2 drops of urine to verify the test product, during the clinical trial at the veterinary clinics. A pilot

study using 5mL, 10 mL and 15mL of feline urine with hematuria placed on the granules showed no significant difference in color change when compared to the use of 2 drops of the same urine on the granules (unpublished data). Hence, 2 drops were considered adequate for the protocol and could easily be used at the veterinary clinic without requiring a large amount of urine from each patient. Finally, as previously mentioned, the reference for true positive classification was the urinary sediment microscopic examination, which is not reliable in cases of urinary erythrolysis which can occur at lower urine Sg or at high pH. However, these urinary conditions (ex. high pH) could reoccur in various urinary pathologic disorders and the analytical conditions would be reproduced using standard laboratory equipment (dipsticks and microscopes), hence their integration in the statistical analysis was deemed a necessary part of the protocol and the statistical results thus better represent the realities encountered in veterinary medicine.

## **4.7 Conclusion**

In conclusion, the chromogenic screening product showed a relevant lower limit of repeatable detection at 100 RBC/ $\mu$ L (approximately equivalent to 12 RBC/HPF) and a very good sensitivity (91,5%), specificity (90,9%), positive predictive value (93,5%) and negative predictive value (88,2%) in this population. However, the reactivity of the granules can diminish when urinary  $\text{pH} \geq 8$  and/or  $\text{Sg} > 1.050$  and a negative response in those cases would need verification. Overall, the screening product demonstrated the required metric characteristics for a reliable use in clinical monitoring of feline hematuria.

## 4.8 References

1. Dorsch R, Remer C, Sauter-Louis C, Hartmann K. Feline lower urinary tract disease in a German cat population. A retrospective analysis of demographic data, causes and clinical signs. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere*. 2014;42(4):231-9.
2. Hostutler RA, Chew DJ, DiBartola SP. Recent concepts in feline lower urinary tract disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2005;35(1):147-70, vii.
3. Buffington CA, Chew DJ, Kendall MS, Scrivani PV, Thompson SB, Blaisdell JL, et al. Clinical evaluation of cats with nonobstructive urinary tract diseases. *J Am Vet Med Assoc*. 1997;210(1):46-50.
4. Khenifar E, Del Castillo JRE, Gara-Boivin C, editors. Monitoring feline hematuria at home: assessment of a potential screening test. ACVP Congress, Poster Session; 2016; New-Orleans, FL, USA.
5. Bretz F, Gallo P, Maurer W. Adaptive designs: The Swiss Army knife among clinical trial designs? *Clin Trials*. 2017;14(5):417-24.
6. Kairalla JA, Coffey CS, Thomann MA, Muller KE. Adaptive trial designs: a review of barriers and opportunities. *Trials*. 2012;13:145.
7. Tilley LP, Smith FWK. *Blackwell's five-minute veterinary consult. Canine and feline*. 5th ed. Chichester, West Sussex: Wiley-Blackwell; 2011. lxii, 1538 p. p.
8. Stockham SL, Scott MA. *Fundamentals of veterinary clinical pathology*. 2nd ed. Ames, Iowa: Blackwell Pub.; 2008. ix, 908 p., 16 p. of plates p.
9. Chew DJ, DiBartola SP. *Interpretation of Canine and Feline Urinalysis*. Company NPP, editor. Wilmington, Delaware, USA: The Gloyd Group, Inc.; 2004.
10. Osborne C, Stevens, JB. Urinalysis: a clinical guide to compassionate patient care. In: Corporation B, editor. Shawnee Mission, KS, USA1999. p. 108.
11. Wray JD, editor *Haematuria*. BSAVA Congress; 2008; Birmingham, UK.
12. Reppas G, Foster SF. Practical urinalysis in the cat: 1: Urine macroscopic examination 'tips and traps'. *J Feline Med Surg*. 2016;18(3):190-202.
13. Kruger JM, Lulich JP, MacLeay J, Merrills J, Paetau-Robinson I, Brejda J, et al. Comparison of foods with differing nutritional profiles for long-term management of acute nonobstructive idiopathic cystitis in cats. *J Am Vet Med Assoc*. 2015;247(5):508-17.
14. Bailiff NL, Westropp JL, Nelson RW, Sykes JE, Owens SD, Kass PH. Evaluation of urine specific gravity and urine sediment as risk factors for urinary tract infections in cats. *Vet Clin Pathol*. 2008;37(3):317-22.
15. Reine NJ, Langston CE. Urinalysis interpretation: how to squeeze out the maximum information from a small sample. *Clin Tech Small Anim Pract*. 2005;20(1):2-10.
16. Loo R, Whittaker J, Rabrenivich V. National practice recommendations for hematuria: how to evaluate in the absence of strong evidence? *Perm J*. 2009;13(1):37-46.
17. Forrester SD. Diagnostic approach to hematuria in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2004;34(4):849-66.
18. Lund HS, Krontveit RI, Halvorsen I, Eggertsdottir AV. Evaluation of urinalyses from untreated adult cats with lower urinary tract disease and healthy control cats: predictive abilities and clinical relevance. *J Feline Med Surg*. 2013;15(12):1086-97.

19. Matulewicz RS, DeLancey JO, Pavey E, Schaeffer EM, Popescu O, Meeks JJ. Dipstick Urinalysis as a Test for Microhematuria and Occult Bladder Cancer. *Bladder Cancer*. 2017;3(1):45-9.
20. Bataille A, Wetzstein M, Hertig A, Vimont S, Rondeau E, Galichon P. Evidence of dipstick superiority over urine microscopy analysis for detection of hematuria. *BMC Res Notes*. 2016;9(1):435.
21. Chen L, Yun J, Zhang H, Dai B. Association equilibrium model. I. Influence of pH and salt concentration on ion-exchanger. *J Chromatogr A*. 2019.
22. Moore GP, Robinson M. Do urine dipsticks reliably predict microhematuria? The bloody truth! *Ann Emerg Med*. 1988;17(3):257-60.
23. Blücare Lab I. Blücare Insert: For the early detection of hematuria in cats 2019 [Available from: [https://blucarelab.com/content/themes/blucare/dist/files/BLU-17114\\_BI%C3%BCcare\\_Insert.R5.pdf](https://blucarelab.com/content/themes/blucare/dist/files/BLU-17114_BI%C3%BCcare_Insert.R5.pdf)].



Table 1. Dilution protocol of RBC in the different pools of urine

Dilution Rank	Volume added from previous tube (μL)	Volume of pooled urine added (μL)	Total volume (μL)	Concentration (RBC/μL)
0 = stock	-	0	1000	8 540 000
1	150	1850	2000	640 500
2	100	1900	2000	32 025
3	600	11400	12000	1 601
4	6000	6000	12000	801
5	6000	6000	12000	400
6	6000	6000	12000	200
7	6000	6000	12000	100
8	6000	6000	12000	50
9	6000	6000	12000	25
10	6000	6000	12000	13
11	6000	6000	12000	6
12	6000	6000	12000	3
13 = control	0	1000	1000	0

Table 2. Ordered levels and observation frequencies of the urinary variables

Variable	Type of variable	Ordered levels of the variable				
		Null	Lowest	2 <sup>nd</sup> lowest	3 <sup>rd</sup> lowest	Highest
Hematuria status (microscopic counting threshold of RBC)	Binary (RBC/HPF)	0 (≤ 5) <b>33 (41.3%)</b>		1 (> 5) <b>47 (58.8%)</b>		
RBC Score (Microscopic counting of RBC)	Ordinal (RBC/HPF)	0 (0 to 5) <b>33 (41.3%)</b>	1+ (6 to 15) <b>9 (11.3%)</b>	2+ (16 to 25) <b>6 (7.5%)</b>	3+ (25 to 49) <b>6 (7.5%)</b>	4+ (≥50) <b>26 (32.5%)</b>
Dipstick Blood (Number of RBC/μL at the dipstick reading)	Ordinal (RBC/μL)	0 (Negative) <b>22 (27.5%)</b>	1+ (10) <b>8 (10%)</b>	2+ (25) <b>6 (7.5%)</b>	3+ (50) <b>8 (10%)</b>	4+ (>250) <b>36 (45%)</b>
Granule Score (Response of the screening product)	Ordinal (color intensity)	0 (white) <b>34 (42.5%)</b>	1+ (faint) <b>8 (10%)</b>	2+ (medium) <b>11 (13.8%)</b>	3+ (dark) <b>27 (33.8%)</b>	
Dipstick Proteinuria (Protein concentration at the dipstick reading)	Ordinal (mg/dL)	0 (0.3) <b>9 (11.3%)</b>	1+ (1.0) <b>51 (63.8%)</b>	2+ (3.0) <b>6 (7.5%)</b>	3+ (20) <b>14 (17.5%)</b>	
Color (n=79)	Ordinal	Yellow <b>52 (65.8%)</b>		Amber <b>17 (21.5%)</b>		Red <b>10 (12.7%)</b>
Sg (specific gravity read with refractometer)	Discretized continuous (g/mL)	0 (<1.012) <b>2 (2.5%)</b>	1 (1.012 – 1.024) <b>8 (10%)</b>	2 (1.024 – 1.036) <b>14 (17.5%)</b>	3 (1.036 – 1.048) <b>18 (22.5%)</b>	4 (>1.048) <b>38 (47.5%)</b>
pH (value read on the dipstick)	Discretized continuous	0 (pH < 6) <b>13 (16.3%)</b>	1 (6 – 7) <b>43 (53.8%)</b>	2 (7 – 8) <b>18 (22.5%)</b>	3 (pH > 8) <b>6 (7.5%)</b>	
Method of collection (n=79)	Nominal	Spontaneous <b>39 (49.4%)</b>		Induced <b>24 (30.4%)</b>		Cystocentesis <b>16 (20.3%)</b>

Table 3. Hematuric vs non hematuric cats among the different categories of the Dipstick Blood values. (A case with a microscopic finding  $\leq 5$  RBC/HPF is considered non-hematuric, and inversely at  $> 5$  RBC/HPF considered hematuric)

Dipstick Blood category	approximate conversion in RBC/HPF	total of cats in the category	hematuric or non hematuric status
0=negative for blood	0	<b>22</b>	hematuric: <b>0</b> non hematuric: <b>22 (100%)</b>
1+=5 - 10 RBC/ $\mu$ L	2 - 2.5	<b>8</b>	hematuric: <b>3 (37.5%)</b> non hematuric: <b>5 (62.5%)</b>
2+=25 RBC/ $\mu$ L	4	<b>6</b>	hematuric: <b>2 (33.3%)</b> non hematuric: <b>4 (66.7%)</b>
$\nabla$ RBC/ $\mu$ L=5 limit for declaring a cat hematuric			
3+=50 RBC/ $\mu$ L	10	<b>8</b>	hematuric: <b>7 (87.5%)</b> non hematuric: <b>1 (12.5%)</b>
4+=>250 RBC/ $\mu$ L	> 27	<b>36</b>	hematuric: <b>35 (97.2%)</b> non hematuric: <b>1 (2.8%)</b>

Table 4. Correspondence between Dipstick Blood reading and microscopic examination of RBC.

Disptick Blood reading	non-hematuric cat (microscopic observation $\leq 5$ RBC/HPF)	hematuric cat (microscopic observation $> 5$ RBC/HPF)	Total Cats
non-hematuric (Dipstick Blood reading 0, 1+ or 2+)	<b>31</b>	<b>5</b>	36
hematuric (Dipstick Blood reading 3+ or 4+)	<b>2</b>	<b>42</b>	44

Figure 1. Chromogenic intensity scale of the result of the granules.



Figure 2. Coloration of the granules with the pooled feline urine at Sg=1.026, pH=6, proteinuria=0.3mg/dL.

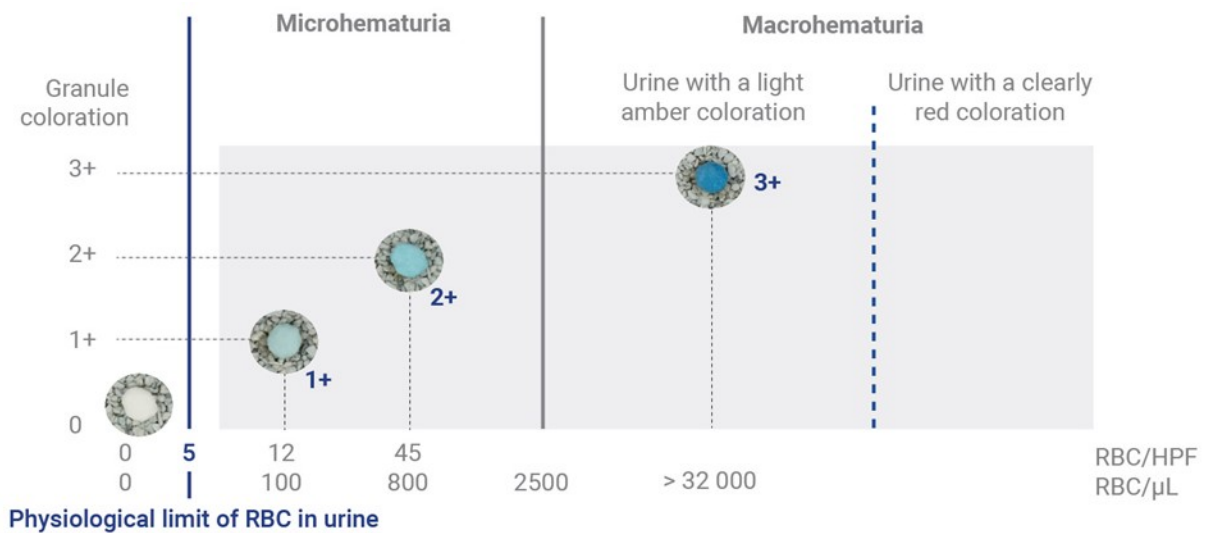
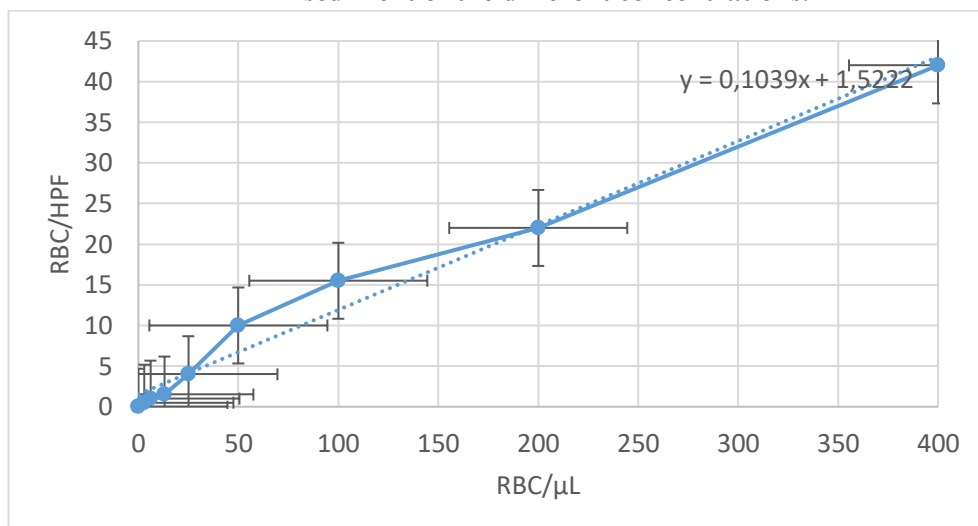
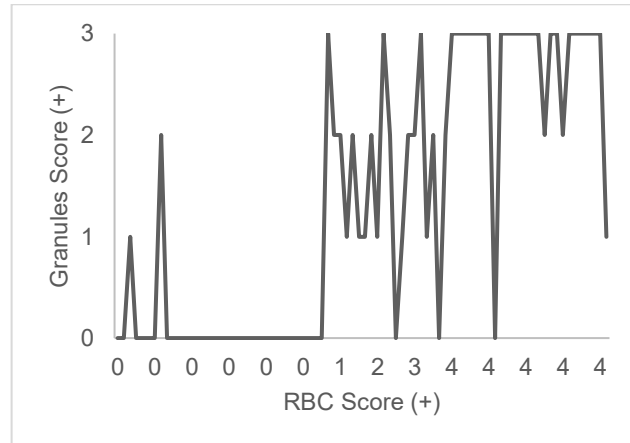


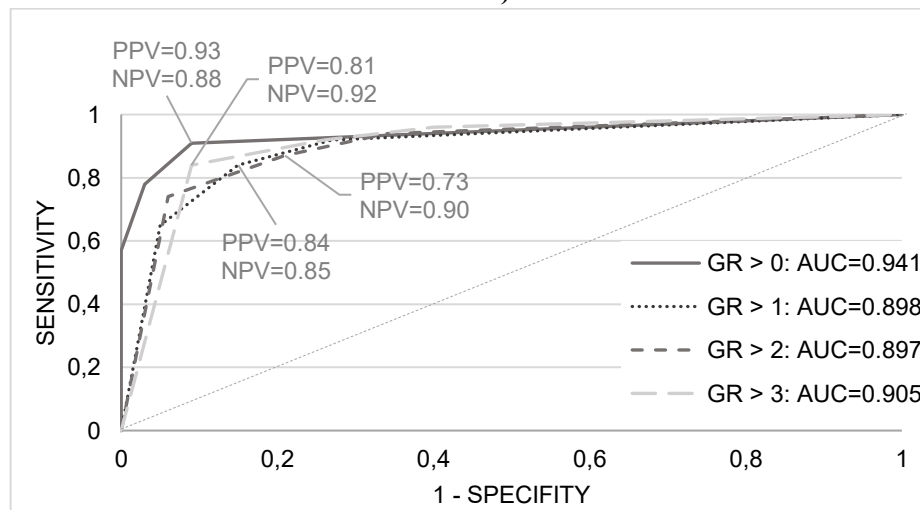
Figure 3. Approximative correspondence between RBC/ $\mu$ L and the average number of RCB/HPF counted on 20 fields at the microscopic examination of 5mL of the urinary sediment of the different concentrations.



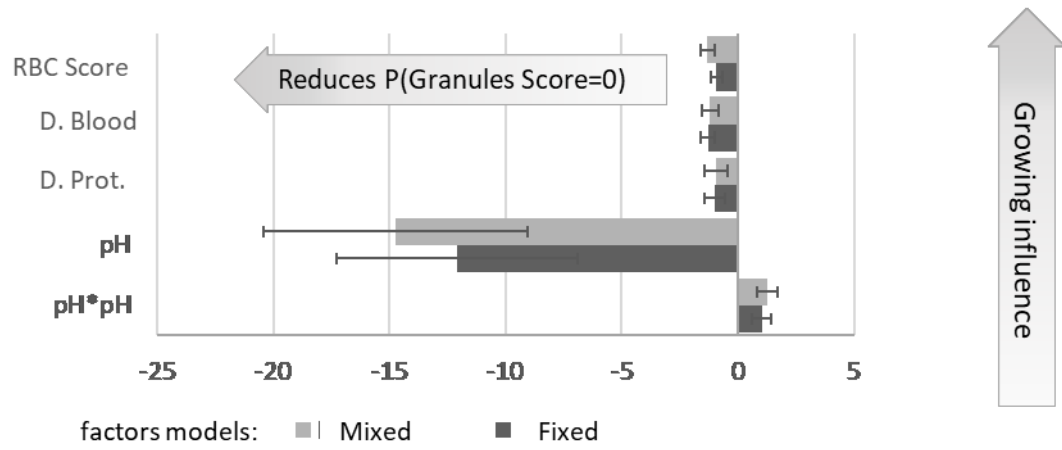
**Figure 4. Graphics of the response of the screening test (Granules Score) vs the encoding count of RBC/HPF (RBC Score) observed during microscopic examination of the urinary sediment 80 cats.**



**Figure 5. ROC Curves of the microscopic RBC prediction by the screening test. PPV and NPV values at each level of the color scale (GR: RBC Score, AUC: Area Under the Curve).**



**Figure 6. Comparison of logistic ordinal regression coefficients of both models for the response variable Granules Score. (D. Blood=Dipstick Blood, D. Prot=Dipstick Proteinuria)**



## 5. DISCUSSION GENERALE

En premier lieu, l'intérêt du dépistage de l'hématurie chez le chat semble être le point fondamental à valider. En effet, bien qu'il existe des études montrant la présence de plus de 10 GR/CFG dans plus de 91% des cas d'ABAU (Dorsch, Remer et al. 2014), nombre qui permet de supposer un fort lien entre ces désordres urinaires et la présence d'hématurie, il n'existe pas d'étude à notre connaissance reliant de façon claire et précise les avantages d'une détection précoce de l'hématurie dans la gestion des maladies du bas appareil urinaire félin. Nous ne faisons que supposer ici, en nous basant sur notre expérience et cette forte proportion de patients souffrant d'ABAU qui sont également hématuriques, que la microhématurie serait potentiellement un bon indicateur précoce des ABAU. Des études intégrant le statut hématurique du chat, le stade d'une éventuelle ABAU ainsi que le succès de la gestion de la pathologie sous-jacente selon un dépistage précoce ou non de l'hématurie sont à envisager pour pouvoir confirmer cette hypothèse.

Dans l'étude, la population de chats qui a été sélectionnée est artificielle, non représentative d'une population réelle, et a sur-représenté les chats présentés pour une urologie et ayant des pathologies du système urinaire. Ainsi, les valeurs extrinsèques au test (à savoir la valeur prédictive positive et la valeur prédictive négative, dépendant fortement de la prévalence de l'hématurie dans la population visée) sont difficilement interprétables hors d'un bassin de sujets avec un historique d'ABAU. Cependant, au vu de l'importance des maladies urinaires chez le chat (Klausner, Lund 2014 ; Bartlett, Van Buren et al. 2010), il serait également intéressant de réaliser une étude sur la population féline en général, afin de déterminer les caractéristiques métriques d'un tel test de dépistage sur un bassin d'animaux encore plus large. Ces pathologies étant fréquentes et évolutives (avec parfois de graves complications) chez une espèce ayant tendance à masquer d'éventuels signes de douleur (Hellyer, Rodan et al. 2007), un dépistage occasionnel de l'hématurie pourrait permettre au vétérinaire d'intervenir plus précocement.

Notons que ce genre de procédé de test possède l'avantage de ne pas avoir à récolter de l'urine chez le chat pour l'analyser, collecte effectivement compliquée chez cette espèce. Il serait également intéressant de voir si ces produits pourraient être dérivables

à d'autres espèces également sujettes aux pathologies urinaires, comme le chien, le lapin ou le furet (Klausner, Lund 2014).

Toujours concernant les possibilités offertes par ce type de technologie, à partir de cette même matrice, d'autres réactifs pourraient également être intégrés afin de déterminer la présence de différents biomarqueurs. Rappelons les informations précieuses qui peuvent être apportées par la détermination de la présence de certains éléments dans l'urine, notamment le glucose, les corps cétoniques et les protéines (Maurey 2005, Callens and Bartges 2015).

A ce sujet, et malgré l'importance des informations apportées par les analyses d'urine, les examens urinaires nous semblent encore faiblement intégrés à l'examen de routine chez les chats. Soit que la récolte non invasive puisse être compliquée, soit que les propriétaires soient rétifs à l'idée de procéder à un prélèvement plus invasif en l'absence de justification « suffisante » à leurs yeux, mais il nous apparaît que ces informations précieuses puissent parfois être sous-utilisées. Or, l'analyse d'urine devrait faire systématiquement partie d'un examen (Callens and Bartges 2015).

Concernant l'étude en elle-même, certains points à examiner de plus près sont abordés dans la discussion de l'étude en elle-même (cf. §4). Un point général dont il serait pertinent de débattre ici est le format particulier et novateur en médecine vétérinaire d'étude « adaptative » dans le cadre de l'étude d'un test de dépistage. Ce procédé est connu en médecine humaine, et notamment en pharmacologie pour apporter une agilité plus importante que les schémas « classiques » et éviter de passer par une étude pilote (Kairalla, Coffey et al. 2012, Bretz, Gallo et al. 2017). Il permet, grâce à une analyse intérimaire, de potentiellement réadapter le protocole en cours d'étude. Ce type d'étude semble très intéressant pour gagner du temps ; mais il faut tout de même souligner que pour une étude sur un produit aussi nouveau que le test de dépistage ici étudié, un pilote aurait tout de même pu apporter des informations utiles et aurait facilité l'analyse de données qui a ici été complexe.

A propos des limites de l'étude, l'une d'entre elles réside dans la procédure suivie pour tester l'épreuve de dépistage : 2 gouttes étaient déposées sur chaque granule, et la lecture s'effectuait après 3 minutes. Bien qu'une correspondance ait été testée auparavant en laboratoire entre la réponse colorimétrique des granules avec une

miction complète de chat (5, 10 et 15mL) et avec 2 gouttes, la méthodologie de l'étude ne représente pas l'utilisation réelle du test. Cependant, nous ne disposions pas de mictions complètes pour le test de l'épreuve de dépistage, le personnel vétérinaire ayant besoin généralement de toute l'urine récoltée pour l'analyse urinaire complète. La seconde remarque de ce point concerne la lecture à 3 minutes : pour des raisons pratiques, nous ne voulions pas demander aux équipes des cliniques vétérinaires de garder les différents tests 48h dans leur laboratoire. Dans la recommandation d'utilisation de l'épreuve de dépistage, le fabricant conseille d'effectuer une lecture dans les 48h ; or lors de notre analyse sur le seuil de dépistage, on a pu voir qu'une faible diminution de la coloration bleutée des granules pouvait apparaître entre 3 minutes et 48h, notamment lorsque la microhématurie est très légère (dans notre étude, lorsque la concentration en GR est comprise entre 50 et 426/ $\mu$ L). Notons que cette diminution de coloration reste très peu significative, mais s'il fallait refaire l'étude, des observations à 3 et 30 min, ainsi qu'à 24 et 48h seraient intéressantes.

Une autre limite de l'étude, qui a été rapportée dans la discussion §4 mais qui mérite d'être développée ici, est la méthode de référence (ou le « gold standard ») utilisée pour confirmer / infirmer les réponses de l'épreuve de dépistage : le comptage via la microscopie. On sait qu'avec un pH urinaire faible et / ou avec densité urinaire faible par exemple, de l'hémoglobine libre peut se retrouver dans l'urine suite à une hémolyse (Stockham and Scott 2008). Les méthodes de mesure chimique (telles que la bandelette et les granules du test) vont alors détecter l'hémoglobine mais la microscopie ne va pas le confirmer. On a ainsi relevé deux cas (2/80) que l'on a considéré dans notre étude comme faux positifs, cependant la plage sang de la bandelette avait également une réponse positive et une hémolyse pouvait être suspectée dans les deux cas. Ces cas ont donc possiblement été mal classés ; ils étaient potentiellement de vrais positifs. La Sp et la VPP de notre étude sont ainsi possiblement sous-estimées. En médecine humaine également, dans le dépistage de certaines pathologies, l'utilisation de la microscopie comme mesure de référence est remise en question au profit de méthodes chimiques (Matulewicz, DeLancey et al. 2017).

Notons que pour palier à ce problème, une analyse statistique de type Bayésienne aurait pu être envisagée, analyse qui permet de travailler avec une méthode de



référence biaisée, ou même sans méthode de référence (Sanogo, Abatih et al. 2014). Cependant, ce modèle semble être d'un niveau de complexité encore supérieur, et il aurait certainement fallu plus de cas pour affiner l'analyse.

Ce qui nous amène à l'une des difficultés majeures rencontrée lors du projet : le recrutement de cas dans la seconde branche. Rappelons que, ni le personnel des cliniques vétérinaires ni les propriétaires participants n'étaient rémunérés (sauf exception en cas de retour pour un « faux positif »). Or, expliquer l'étude et le protocole aux propriétaires demandait du temps aux équipes vétérinaires, temps qu'ils nous accordaient déjà généreusement en incluant l'épreuve de dépistage dans leur analyse de routine pour le premier groupe. Avec un budget plus important, il serait intéressant de rémunérer à la fois les structures vétérinaires et les propriétaires participants, afin de les dédommager pour le temps passé sur le projet.

Une rémunération aurait également pu encourager les propriétaires de chat dont l'épreuve de dépistage était positive à se présenter plus rapidement au vétérinaire : certains ont attendu plus de 4 jours pour se déplacer en consultation. Or, dans cette branche 2, nous voulions étudier de potentiels modificateurs de statuts responsables d'éventuels faux positifs ; dans l'intervalle de temps entre la réponse du test chez le propriétaire et l'analyse d'urine au vétérinaire, la composition urinaire a pu changer et un éventuel modificateur de statut a pu disparaître.

Concernant à présent l'épreuve de dépistage en elle-même, quelques limites ont pu être déterminées par l'étude et sont maintenant inscrites dans le guide d'utilisation du fabricant : lorsque la densité urinaire  $> 1,050$  et/ou que le  $\text{pH}_{\text{urinaire}} \geq 8$ , une réponse négative du test ne peut pas être considérée comme fiable. Considérant que certains chats avec des ABAU peuvent avoir des densités urinaires élevées, on pourrait voir cette caractéristique comme un obstacle. Cependant, rappelons que pour ces chats dont la densité urinaire est élevée, notre étude a montré que la concentration en GR était généralement élevée également, et que le test était tout de même capable de détecter de la microhématurie pour ces individus. Nous pouvons soumettre l'hypothèse que pour ces chats buvant un faible volume d'eau et concentrant longtemps l'urine dans leur vessie, le temps de saignement et ainsi la concentration en GR sont par la même augmentés. Concernant le pH, certains chats avec des ABAU (tels que les urolithiases à cristaux de struvite par exemple) présentent généralement un  $\text{pH}_{\text{urinaire}} > 7$ . Rappelons

que ce test, utilisé dans un cadre de suivi de pathologie, se fera généralement avec un animal sous diète spécifique à sa condition (ici, une diète acidifiant les urines). Et même dans le cas contraire, sans diète particulière, le  $\text{pH}_{\text{urinaire}}$  d'un chat va varier au cours de la journée. Le test pourrait ne pas être capable de détecter la microhématurie à certains moments de la journée, mais il devrait être performant sur des mictions où le  $\text{pH} < 8$ .

Les caractéristiques métriques de l'épreuve de dépistage ont pu être déterminées lors de l'étude. Comme mentionné précédemment, il est possible que la Sp et la VPP dans cette population aient été sous-estimées. Malgré cela, ces valeurs ( $\text{Se}=91.5\%$ ,  $\text{Sp}=90.9\%$ ,  $\text{VPP}=93.5\%$  et  $\text{VPN} 88.2\%$ ) nous semblent correctes et nous estimons que le test est fiable pour une utilisation dans le cadre d'un suivi de l'hématurie ( $\text{Se}$  et  $\text{Sp}$  sont supérieures à 90%). Il serait intéressant de comparer ces caractéristiques métriques à celles d'autres tests rapides, utilisables à la maison, sans passer par une récolte au préalable de l'urine. Cependant, aucun autre test similaire pour la microhématurie féline ne semble exister sur le marché et aucune étude n'a été retrouvée dans la littérature scientifique au sujet de tels tests chez le chat (ni même concernant de telles épreuves de dépistage d'autres paramètres urinaires félines). Les informations dont nous disposons sur Hemalert®, de Ralston Purina Company, sont peu nombreuses, et les valeurs métriques de ce test ne sont pas dévoilées. Dans tous les cas, ces deux produits ne seraient pas tout à fait comparables ; l'un permettant une lecture dans les 48 heures et l'autre nécessitant une présence du propriétaire pour une lecture rapide après la miction. Nous supposons actuellement que l'arrêt de sa commercialisation est dû à ce manque de praticité dans l'utilisation. En revanche, il existe pour le chat et pour le chien un test rapide de l'hématurie, utilisable à la maison, dont les caractéristiques métriques ont été évaluées par une étude (Krimmer, Tanner et al. 2019), mais nécessitant une récolte d'urine au préalable : le « urine test cup », par Petnostics®, Anaheim, Californie. Il s'agit d'un petit récipient refermable par un couvercle contenant une bandelette urinaire avec 10 plages réactives (glucose, bilirubine, corps cétoniques, densité urinaire, sang, pH, protéines, urobilinogène, leucocytes et nitrites). La lecture de la réponse des différentes plages après un contact avec l'urine testée se fait via une application sur un téléphone intelligent. Cependant, l'étude sur le produit a déterminé que la sensibilité était considérée insuffisante ( $<90\%$ )

pour toutes les plages sauf pour les corps cétoniques (où des faux-positifs sont par contre apparus dans 77.1% des cas). Notons que pour la plage sang spécifiquement, les valeurs intrinsèques du produit étaient  $Se_{\text{plage\_sang}}=36.1\%$  et  $Sp_{\text{plage\_sang}}=93.1\%$ . Ces valeurs étaient jugées en désaccord avec leurs analyses de laboratoire. Dès lors, dans leur conclusion, les chercheurs déconseillaient l'utilisation de ce produit (Krimmer, Tanner et al. 2019). Quant aux litières de silice « surveillant la santé » détaillées §1.8, elles permettent une évaluation du pH urinaire mais ne détectent pas la microhématurie. Ce dernier pouvant connaître des variations physiologiques au cours de la journée, il nous semble plus difficile à interpréter. Ces litières permettent, du fait de leur couleur blanche, de mettre en évidence des changements de la coloration l'urine lorsque ceux-ci sont macroscopiques, et nous estimons qu'elles reflètent des stades pathologiques plus avancés en ce qui a trait aux ABAU.

## 6. CONCLUSION

Notre étude a permis de déterminer les caractéristiques métriques de ce test de dépistage de l'hématurie, à savoir une sensibilité de 91.5%, une spécificité de 90.9%, et, dans le bassin de population de l'étude, une valeur prédictive positive de 93.5% et une valeur prédictive négative de 88.2%. A nos yeux, ces valeurs sont suffisantes pour valider notre hypothèse et permettre un bon suivi de l'hématurie chez les chats ayant un historique de maladie du bas appareil urinaire.

De même, l'utilisation de ce test de suivi de l'hématurie pourrait se révéler intéressante dans le cadre de gestion des maladies du bas appareil urinaire chez le chat. Même si un effet bénéfique est actuellement supposé, d'autres études sont à envisager afin de démontrer l'impact de la détection précoce d'une microhématurie dans la gestion notamment des cystites idiopathiques, des urolithiases et des infections urinaires chez le chat.

## 7. LISTE BIBLIOGRAPHIQUE

- Arnaud, C. (2010). "Evaluation des procédures de dépistage." Deuxième Cycle des Etudes Médicales - Faculté de Médecine de Toulouse Purpan et Toulouse Rangueil, 2019, from [http://www.medecine.ups-tlse.fr/DCEM2/module1/sous\\_module1/011\\_depistage\\_CA\\_SA.pdf](http://www.medecine.ups-tlse.fr/DCEM2/module1/sous_module1/011_depistage_CA_SA.pdf).
- Bailiff, N. L., J. L. Westropp, R. W. Nelson, J. E. Sykes, S. D. Owens and P. H. Kass (2008). "Evaluation of urine specific gravity and urine sediment as risk factors for urinary tract infections in cats." Vet Clin Pathol **37**(3): 317-322.
- Bartges, J. and D. J. Polzin (2011). Nephrology and urology of small animals. Chichester, West Sussex, UK ; Ames, Iowa, Wiley-Blackwell.
- Bartlett, P. C., J. W. Van Buren, M. Neterer and C. Zhou (2010). "Disease surveillance and referral bias in the veterinary medical database." Prev Vet Med **94**(3-4): 264-271.
- Bataille, A., M. Wetzstein, A. Hertig, S. Vimont, E. Rondeau and P. Galichon (2016). "Evidence of dipstick superiority over urine microscopy analysis for detection of hematuria." BMC Res Notes **9**(1): 435.
- Beaver, B. V. G. (2003). Feline behavior : a guide for veterinarians. St. Louis, Mo., Saunders.
- Beer, K. S. and K. J. Drobatz (2016). "Severe anemia in cats with urethral obstruction: 17 cases (2002-2011)." J Vet Emerg Crit Care (San Antonio) **26**(3): 393-397.
- Billet, J. P., A. H. Moore and P. E. Holt (2002). "Evaluation of a bladder tumor antigen test for the diagnosis of lower urinary tract malignancies in dogs." Am J Vet Res **63**(3): 370-373.
- Blücare Lab, I. (2019). "Blücare Insert: For the early detection of hematuria in cats." 2019, from [https://blucarelab.com/content/themes/blucare/dist/files/BLU-17114\\_BI%C3%BCcare\\_Insert.R5.pdf](https://blucarelab.com/content/themes/blucare/dist/files/BLU-17114_BI%C3%BCcare_Insert.R5.pdf).
- Borjesson, D. L. (2003). "Renal cytology." Vet Clin North Am Small Anim Pract **33**(1): 119-134.
- Bretz, F., P. Gallo and W. Maurer (2017). "Adaptive designs: The Swiss Army knife among clinical trial designs?" Clin Trials **14**(5): 417-424.
- Buffington, C. A. (2002). "External and internal influences on disease risk in cats." J Am Vet Med Assoc **220**(7): 994-1002.
- Buffington, C. A. (2004). "Comorbidity of interstitial cystitis with other unexplained clinical conditions." J Urol **172**(4 Pt 1): 1242-1248.
- Buffington, C. A. (2011). "Idiopathic cystitis in domestic cats--beyond the lower urinary tract." J Vet Intern Med **25**(4): 784-796.
- Buffington, C. A., D. J. Chew and S. P. DiBartola (1996). "Interstitial cystitis in cats." Vet Clin North Am Small Anim Pract **26**(2): 317-326.
- Buffington, C. A., D. J. Chew, M. S. Kendall, P. V. Scrivani, S. B. Thompson, J. L. Blaisdell and B. E. Woodworth (1997). "Clinical evaluation of cats with nonobstructive urinary tract diseases." J Am Vet Med Assoc **210**(1): 46-50.
- Buffington, C. A., J. L. Westropp, D. J. Chew and R. R. Bolus (2006). "Clinical evaluation of multimodal environmental modification (MEMO) in the management of cats with idiopathic cystitis." J Feline Med Surg **8**(4): 261-268.

Buffington, C. A., J. L. Westropp, D. J. Chew and R. R. Bolus (2006). "Risk factors associated with clinical signs of lower urinary tract disease in indoor-housed cats." J Am Vet Med Assoc **228**(5): 722-725.

Cai, T., S. Mazzoli, N. Mondaini, F. Meacci, G. Nesi, C. D'Elia, G. Malossini, V. Boddi and R. Bartoletti (2012). "The role of asymptomatic bacteriuria in young women with recurrent urinary tract infections: to treat or not to treat?" Clin Infect Dis **55**(6): 771-777.

Callens, A. J. and J. W. Bartges (2015). "Urinalysis." Vet Clin North Am Small Anim Pract **45**(4): 621-637.

Cameron, M. E., R. A. Casey, J. W. Bradshaw, N. K. Waran and D. A. Gunn-Moore (2004). "A study of environmental and behavioural factors that may be associated with feline idiopathic cystitis." J Small Anim Pract **45**(3): 144-147.

Cannizzo, K. L., M. A. McLoughlin, D. J. Chew and S. P. DiBartola (2001). "Uroendoscopy. Evaluation of the lower urinary tract." Vet Clin North Am Small Anim Pract **31**(4): 789-807, ix.

Carney, H. C., T. P. Sadek, T. M. Curtis, V. Halls, S. Heath, P. Hutchison, K. Mundschenk, J. L. Westropp, P. American Association of Feline and M. International Society of Feline (2014). "AAFP and ISFM Guidelines for diagnosing and solving house-soiling behavior in cats." J Feline Med Surg **16**(7): 579-598.

Chen, L., J. Yun, H. Zhang and B. Dai (2019). "Association equilibrium model. I. Influence of pH and salt concentration on ion-exchanger." J Chromatogr A.

Chew, D. J., T. Buffington, M. S. Kendall, S. D. Osborn and B. E. Woodsworth (1996). "Urethroscopy, cystoscopy, and biopsy of the feline lower urinary tract." Vet Clin North Am Small Anim Pract **26**(3): 441-462.

Chew, D. J. and S. P. DiBartola (2004). Interpretation of Canine and Feline Urinalysis. Wilmington, Delaware, USA, The Gloyd Group, Inc.

Chew, D. J., S. P. DiBartola, P. A. Schenck and D. J. Chew (2011). Canine and feline nephrology and urology. St. Louis, Mo., Elsevier/Saunders.

Colgan, R., L. E. Nicolle, A. McGlone and T. M. Hooton (2006). "Asymptomatic bacteriuria in adults." Am Fam Physician **74**(6): 985-990.

Cotard, J. (1993). Néphrologie et Urologie du Chien et du Chat. P. eds. Paris: pp. 1-33.

Côté, E. (2007). Clinical veterinary advisor : dogs and cats. St. Louis, Mo., Mosby/Elsevier.

Cox, C. E. and F. Hinman, Jr. (1961). "Experiments with induced bacteriuria, vesical emptying and bacterial growth on the mechanism of bladder defense to infection." J Urol **86**: 739-748.

Defauw, P. A., I. Van de Maele, L. Duchateau, I. E. Polis, J. H. Saunders and S. Daminet (2011). "Risk factors and clinical presentation of cats with feline idiopathic cystitis." J Feline Med Surg **13**(12): 967-975.

Delport, P. C. and L. J. Fourie (2005). "Katkor cat litter, a non-invasive method of collecting cat urine for phosphate determination." J S Afr Vet Assoc **76**(4): 233-234.

Dorsch, R., C. Remer, C. Sauter-Louis and K. Hartmann (2014). "Feline lower urinary tract disease in a German cat population. A retrospective analysis of demographic data, causes and clinical signs." Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere **42**(4): 231-239.

Eggertsdottir, A. V., B. K. Saevik, I. Halvorsen and H. Sorum (2011). "Occurrence of occult bacteriuria in healthy cats." J Feline Med Surg **13**(10): 800-803.

Ettinger, S. J. and E. C. Feldman (2000). Textbook of veterinary internal medicine : diseases of the dog and cat. Philadelphia, W.B. Saunders Co.

Ettinger, S. J., E. C. Feldman and E. Côté (2017). Diseases of the Lower Urinary Tract. Textbook of veterinary internal medicine : diseases of the dog and the cat. St. Louis, Missouri, Elsevier: 1985-2036.

Forrester, S. D. (2004). "Diagnostic approach to hematuria in dogs and cats." Vet Clin North Am Small Anim Pract **34**(4): 849-866.

Forrester, S. D. and T. L. Towell (2015). "Feline idiopathic cystitis." Vet Clin North Am Small Anim Pract **45**(4): 783-806.

Forrester, S. D., G. C. Troy, M. N. Dalton, J. W. Huffman and G. Holtzman (1999). "Retrospective evaluation of urinary tract infection in 42 dogs with hyperadrenocorticism or diabetes mellitus or both." J Vet Intern Med **13**(6): 557-560.

Freeman, L. M., D. J. Brown, F. W. Smith and J. E. Rush (1997). "Magnesium status and the effect of magnesium supplementation in feline hypertrophic cardiomyopathy." Can J Vet Res **61**(3): 227-231.

Gara-Boivin, C., J. R. E. del Castillo and E. Khenifar (2018). Ex vivo sensitivity and robustness of a novel home-screening test for feline hematuria. World Veterinary Association Congress Conference, Oral presentation, Barcelona, Spain.

Gerber, B., F. S. Boretti, S. Kley, P. Luluha, C. Muller, N. Sieber, S. Unterer, M. Wenger, M. Fluckiger, T. Glaus and C. E. Reusch (2005). "Evaluation of clinical signs and causes of lower urinary tract disease in European cats." J Small Anim Pract **46**(12): 571-577.

Grauer, G. F. (2008). Urinary Tract Disorders. Small animal internal medicine. R. W. Nelson and C. G. Couto. St. Louis, Mo., Mosby: 607-695.

Grossfeld, G. D., M. S. Litwin, J. S. Wolf, H. Hricak, C. L. Shuler, D. C. Agerter and P. R. Carroll (2001). "Evaluation of asymptomatic microscopic hematuria in adults: the American Urological Association best practice policy--part I: definition, detection, prevalence, and etiology." Urology **57**(4): 599-603.

Grossfeld, G. D., M. S. Litwin, J. S. Wolf, Jr., H. Hricak, C. L. Shuler, D. C. Agerter and P. R. Carroll (2001). "Evaluation of asymptomatic microscopic hematuria in adults: the American Urological Association best practice policy--part II: patient evaluation, cytology, voided markers, imaging, cystoscopy, nephrology evaluation, and follow-up." Urology **57**(4): 604-610.

Grossfeld, G. D., J. S. Wolf, Jr., M. S. Litwan, H. Hricak, C. L. Shuler, D. C. Agerter and P. R. Carroll (2001). "Asymptomatic microscopic hematuria in adults: summary of the AUA best practice policy recommendations." Am Fam Physician **63**(6): 1145-1154.

Gunn-Moore, D. (2003). "Feline lower urinary tract disease." J Feline Med Surg **5**(2): 133-138.

Hajian-Tilaki, K. (2013). "Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation." Caspian J Intern Med **4**(2): 627-635.

Hawthorne, J. C., J. J. deHaan, R. L. Goring, S. R. Randall, F. S. Kennedy, E. Stone, K. M. Zimmerman and S. W. McAbee (1998). "Recurrent urethral obstruction secondary to idiopathic renal hematuria in a puppy." J Am Anim Hosp Assoc **34**(6): 511-514.

Hellyer, P., I. Rodan, J. Brunt, R. Downing, J. E. Hagedorn and S. A. Robertson (2007). "AAHA/AAFP pain management guidelines for dogs and cats." J Feline Med Surg **9**(6): 466-480.

Heuter, K. J., C. A. Buffington and D. J. Chew (1998). "Agreement between two methods for measuring urine pH in cats and dogs." J Am Vet Med Assoc **213**(7): 996-998.

Hiatt, R. A. and J. D. Ordonez (1994). "Dipstick urinalysis screening, asymptomatic microhematuria, and subsequent urological cancers in a population-based sample." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **3**(5): 439-443.

Hostutler, R. A., D. J. Chew and S. P. DiBartola (2005). "Recent concepts in feline lower urinary tract disease." Vet Clin North Am Small Anim Pract **35**(1): 147-170, vii.

Houston, D. M. and A. E. Moore (2009). "Canine and feline urolithiasis: examination of over 50 000 urolith submissions to the Canadian veterinary urolith centre from 1998 to 2008." Can Vet J **50**(12): 1263-1268.

Hunpravit, V., J. P. Lulich, C. A. Osborne and E. Nwaokorie. (2014). "Feline urolith epidemiology update: 1981 to 2012. Tracking the trends of mineral composition in cats with urolithiasis." DVM360 MAGAZINE, from <http://veterinarynews.dvm360.com/feline-urolith-epidemiology-update-1981-2012>.

J., W., C. N. and T. D. (2013). "Incidence and prevalence of asymptomatic bacterial urinary tract infections in healthy, older cats." J Vet Intern Med. **27**: 730-731.

Johnson, J. R., N. Kaster, M. A. Kuskowski and G. V. Ling (2003). "Identification of urovirulence traits in Escherichia coli by comparison of urinary and rectal E. coli isolates from dogs with urinary tract infection." J Clin Microbiol **41**(1): 337-345.

Johnson, J. R., A. L. Stell and P. Delavari (2001). "Canine feces as a reservoir of extraintestinal pathogenic Escherichia coli." Infect Immun **69**(3): 1306-1314.

Kairalla, J. A., C. S. Coffey, M. A. Thomann and K. E. Muller (2012). "Adaptive trial designs: a review of barriers and opportunities." Trials **13**: 145.

Kerr, K. R. (2013). "Companion Animals Symposium: dietary management of feline lower urinary tract symptoms." J Anim Sci **91**(6): 2965-2975.

Khenifar, E., J. R. E. Del Castillo and C. Gara-Boivin (2006). Monitoring feline hematuria at home: assessment of a potential screening test. ACVP Congress, Poster Session, New-Orleans, FL, USA.

Khenifar, E., J. R. E. del Castillo and C. Gara-Boivin (2016). Monitoring feline hematuria at home: assessment of a potential screening test. American College of Veterinary Pathologists Congress, Poster Session, New Orleans, Louisiana, USA.

Khenifar, E., J. R. E. del Castillo and C. Gara-Boivin (2018). Ex vivo sensitivity and robustness of a novel home-screening test for feline hematuria. The International Society of Feline Medicine Congress Poster Session, Sorrento, Italy, Journal of Feline Medicine and Surgery.

Khenifar, E., J. R. E. del Castillo and C. Gara-Boivin (2018). Reliability assessment of a novel home-screening test for feline hematuria. World Veterinary Association Congress Conference, Poster session, Barcelona, Spain.

Khenifar, E., J. R. E. del Castillo and C. Gara-Boivin (2018). Reliability assessment of a novel home-screening test for feline hematuria. The International Society of Feline Medicine Congress Poster Session, Sorrento, Italy, Journal of Feline Medicine and Surgery.

Kirk, R. W. (2009). Kirk's current veterinary therapy. St. Louis, Mo., Elsevier Saunders: volumes.

Klausner, J. and E. M. Lund. (2014). "State of pet health 2014.", from [https://www.banfield.com/Banfield/media/PDF/Downloads/soph/Banfield-State-of-Pet-Health-Report\\_2014.pdf](https://www.banfield.com/Banfield/media/PDF/Downloads/soph/Banfield-State-of-Pet-Health-Report_2014.pdf).

Krimer, P. M., M. C. Tanner and M. S. Camus (2019). "Evaluation of a Home Urinalysis Kit in Dogs." J Am Anim Hosp Assoc.

Kruger, J. M., J. P. Lulich, J. MacLeay, J. Merrills, I. Paetau-Robinson, J. Brejda and C. A. Osborne (2015). "Comparison of foods with differing nutritional profiles for



long-term management of acute nonobstructive idiopathic cystitis in cats." J Am Vet Med Assoc **247**(5): 508-517.

Kruger, J. M., C. A. Osborne and J. P. Lulich (2009). "Changing paradigms of feline idiopathic cystitis." Vet Clin North Am Small Anim Pract **39**(1): 15-40.

Lees, G. E. (1996). "Bacterial urinary tract infections." Vet Clin North Am Small Anim Pract **26**(2): 297-304.

Lekcharoensuk, C., C. A. Osborne and J. P. Lulich (2001). "Epidemiologic study of risk factors for lower urinary tract diseases in cats." J Am Vet Med Assoc **218**(9): 1429-1435.

Leveille, R. (1998). "Ultrasonography of urinary bladder disorders." Vet Clin North Am Small Anim Pract **28**(4): 799-821.

Litster, A., S. Moss, J. Platell and D. J. Trott (2009). "Occult bacterial lower urinary tract infections in cats-urinalysis and culture findings." Vet Microbiol **136**(1-2): 130-134.

Littman, M. P., G. W. Niebauer and M. J. Hendrick (1990). "Macrohematuria and life-threatening anemia attributable to subepithelial vascular ectasia of the urinary bladder in a dog." J Am Vet Med Assoc **196**(9): 1487-1489.

Loo, R., J. Whittaker and V. Rabrenivich (2009). "National practice recommendations for hematuria: how to evaluate in the absence of strong evidence?" Perm J **13**(1): 37-46.

Low, D. A., B. A. Braaten, G. V. Ling, D. L. Johnson and A. L. Ruby (1988). "Isolation and comparison of Escherichia coli strains from canine and human patients with urinary tract infections." Infect Immun **56**(10): 2601-2609.

Lund, H. S., R. I. Krontveit, I. Halvorsen and A. V. Eggertsdottir (2013). "Evaluation of urinalyses from untreated adult cats with lower urinary tract disease and healthy control cats: predictive abilities and clinical relevance." J Feline Med Surg **15**(12): 1086-1097.

Matulewicz, R. S., J. O. DeLancey, E. Pavey, E. M. Schaeffer, O. Popescu and J. J. Meeks (2017). "Dipstick Urinalysis as a Test for Microhematuria and Occult Bladder Cancer." Bladder Cancer **3**(1): 45-49.

Maurey, C. (2005). "Sémiologie biologique urinaire." EMC-Vétérinaire **2**: 156-168.

McCarthy, T. C. (1996). "Cystoscopy and biopsy of the feline lower urinary tract." Vet Clin North Am Small Anim Pract **26**(3): 463-482.

McGhie, J. A., J. Stayt and G. L. Hosgood (2014). "Prevalence of bacteriuria in dogs without clinical signs of urinary tract infection presenting for elective surgical procedures." Aust Vet J **92**(1-2): 33-37.

Meinkoth, J. H. and R. L. Cowell (2002). "Recognition of basic cell types and criteria of malignancy." Vet Clin North Am Small Anim Pract **32**(6): 1209-1235, v.

Moore, G. P. and M. Robinson (1988). "Do urine dipsticks reliably predict microhematuria? The bloody truth!" Ann Emerg Med **17**(3): 257-260.

Neilson, J. C. (2003). "Feline house soiling: elimination and marking behaviors." Vet Clin North Am Small Anim Pract **33**(2): 287-301.

Nicolle, L. E., S. Bradley, R. Colgan and e. al. (2005). "Infectious Diseases Society of America guidelines for the diagnosis and treatment of asymptomatic bacteriuria in adults." **40**: 643.

Osborne, C. A., J. S. Klausner and G. E. Lees (1979). "Urinary-tract infections—normal and abnormal host defense-mechanisms." Vet Clin North Am Small Anim Pract **9**(9): 587-609

- Osborne, C. A., J. M. Kruger and J. P. Lulich (1996). "Feline lower urinary tract disorders. Definition of terms and concepts." Vet Clin North Am Small Anim Pract **26**(2): 169-179.
- Osborne, C. A., J. P. Lulich, L. L. Swanson and H. Albasan (2009). "Drug-induced urolithiasis." Vet Clin North Am Small Anim Pract **39**(1): 55-63.
- Osborne, C. A., J. B. Stevens and L. K. Ulrich (1999). Urinalysis : a clinical guide to compassionate patient care. Leverkusen, Germany; Shawnee Mission, KS, Bayer AG; Bayer Corp., Agricultural Division, Animal Health.
- Palm, C. and J. Westropp (2011). "Cats and calcium oxalate: strategies for managing lower and upper tract stone disease." J Feline Med Surg **13**(9): 651-660.
- Picavet, P., J. Detilleux, S. Verschuren, A. Sparkes, J. Lulich, C. Osborne, L. Istasse and M. Diez (2007). "Analysis of 4495 canine and feline uroliths in the Benelux. A retrospective study: 1994-2004." J Anim Physiol Anim Nutr (Berl) **91**(5-6): 247-251.
- Piech, T. L. and K. L. Wycislo (2019). "Importance of Urinalysis." Vet Clin North Am Small Anim Pract **49**(2): 233-245.
- Prater, R. and H. Tvedten (2004). Hemostatic abnormalities. Small animal clinical diagnosis by laboratory methods. M. D. Willard and H. Tvedten. Philadelphia, WB Saunders: 92-112.
- Reine, N. J. and C. E. Langston (2005). "Urinalysis interpretation: how to squeeze out the maximum information from a small sample." Clin Tech Small Anim Pract **20**(1): 2-10.
- Reppas, G. and S. F. Foster (2016). "Practical urinalysis in the cat: 1: Urine macroscopic examination 'tips and traps'." J Feline Med Surg **18**(3): 190-202.
- Reppas, G. and S. F. Foster (2016). "Practical urinalysis in the cat: 2: Urine microscopic examination 'tips and traps'." J Feline Med Surg **18**(5): 373-385.
- Saevik, B. K., C. Trangerud, N. Ottesen, H. Sorum and A. V. Eggertsdottir (2011). "Causes of lower urinary tract disease in Norwegian cats." J Feline Med Surg **13**(6): 410-417.
- Sanogo, M., E. Abatih and C. Saegerman (2014). "Bayesian versus frequentist methods for estimating true prevalence of disease and diagnostic test performance." Vet J **202**(2): 204-207.
- Schaer, M. and F. Gaschen (2016). The Clinical Medicine of the Dog and Cat.
- Scherk, M., C. A. Buffington, E. Carozza, T. Curtis, K. Duncan, J. Kruger and D. McKelvey. (2018, 2018). "Blücare® Granules: A Novel Tool for the Early Detection and Monitoring of Urinary Tract disorders in Cats, Recommendations from an Expert Panel." 2019, from <https://www.linkedin.com/company/bl%C3%BCcare-lab/?originalSubdomain=fr>.
- Seguin, M. A., S. L. Vaden, C. Altier, E. Stone and J. F. Levine (2003). "Persistent urinary tract infections and reinfections in 100 dogs (1989-1999)." J Vet Intern Med **17**(5): 622-631.
- Søreide, K., B. Bharti and S. Bharti (2009). "Receiver-operating characteristic curve analysis in diagnostic, prognostic and predictive biomarker research: trade-off between sensitivity and specificity with change of test cut-offs." J Clin Pathol **62**(11): 1051.
- Stockham, S. L. and M. A. Scott (2008). Fundamentals of veterinary clinical pathology. Ames, Iowa, Blackwell Pub.
- Thrall, D. E. (2013). Textbook of veterinary diagnostic radiology. St. Louis, Missouri, Elsevier.

Tilley, L. P. and F. W. K. Smith (2011). Blackwell's five-minute veterinary consult. Canine and feline. Chichester, West Sussex, Wiley-Blackwell.

Valli, V. E., A. Norris, R. M. Jacobs, E. Laing, S. Withrow, D. Macy, J. Tomlinson, D. McCaw, G. K. Ogilvie, G. Pidgeon and et al. (1995). "Pathology of canine bladder and urethral cancer and correlation with tumour progression and survival." J Comp Pathol **113**(2): 113-130.

Wan, S. Y., F. A. Hartmann, M. K. Jooss and K. R. Viviano (2014). "Prevalence and clinical outcome of subclinical bacteriuria in female dogs." J Am Vet Med Assoc **245**(1): 106-112.

Weese, J. S., J. M. Blondeau, D. Boothe, E. B. Breitschwerdt, L. Guardabassi, A. Hillier, D. H. Lloyd, M. G. Papich, S. C. Rankin, J. D. Turnidge and J. E. Sykes (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." Vet Med Int **2011**: 263768.

Zacharias, D. (2008). Spécificités des infections du tractus urinaire chez le chat, Université Claude-Bernard – Lyon I.