

E-post fra Tore Sivertsen til Leon Cantas, 08.06.2012, m/kopi til andre medforfattere:

Hei igjen,

Her kommer respons fra meg:

For det første:

Jeg er virkelig imponert, Leon!

Da du sa at du skulle komme med et manus til 17. mai, må jeg si at jeg tok det med en klype salt. Men etter alt jeg forstå fikk Henning ditt første utkast 18. mai, og vi får altså dette videre bearbejdet utkastet 2. juni.

I mellomtiden, siden februar, er det viktigste av labb-arbeidet gjort, resultatene bearbejdet, og dette utkastet skrevet; ved siden av fullt arbeid på annet hold. I sannhet en imponerende effektivitet! Jeg sier med Odd Børretzen, i en av de vemodige visene hans: *Skulle ønske det var meg...*

Derneft:

Så vidt jeg kan forstå er det også flere spennende resultater her.

Fig 3: Den kraftige økningen i ekspresjon av mobilitetsgenene ved behandling med TC og med ineffektive nivåer av EF hadde dere vel ventet, men den er virkelig slående. Reduksjonen i den samme ekspresjonen med Metacam, og økningen ved Zoolac, går kanskje mer i klassen observasjoner som bør noteres, men foreløpig ikke overtolkes? Jeg spør med amatørrens interesse; dette er det dere som forstår.

Fig 1: Disse resultatene har jeg heller ikke forstand på, men jeg oppfatter dem vel nærmest som en bekreftelse på at antibiotikaene og de andre behandlingene virket/ ikke virket som forventet, overfor denne resistente stammen av E.coli.

Det som overrasket meg litt, var at det var så stabilt forhold mellom resultatene for qPCR (Log10 16S rDNA copy numbers) og for Log10 CFU, fra gruppe til gruppe. Dette er jo uavhengige analyser, hvorfor blir forholdet så stabilt?

Kommer det av at dette er nyfødte, inokulerte grisunger, så det er stort sett E. coli en finner med qPCR også?

Fig 2; serumproteiner og klinisk kjemi:

Disse resultatene har jeg litt mer spørsmål om:

Hvis jeg forstår manuset riktig, er det dere har brukt i denne figuren verdiene av *den beregnede responsparameteren beskrevet på s. 9* : $C/B / B/A = CxA/B^2$. Slike avledete parametere kan være nyttige, men bruken av dem kan også inneholde fallgruver, og den bør begrunnes.

Når jeg prøver å sette meg i rollen som uavhengig leser/ referee/ evt. djevelens advokat, så dukker følgende spørsmål opp:

Jeg forstår det som A er verdien målt i den første blodprøven, B er verdien målt i blodprøve ved 6-8 timer (dvs tidspunkt med synlige sjukdomstegn, for alle behandlede grupper), og C er verdien målt i blodprøve før avliving.

MEN:

- I gruppene som fikk placebo og tetracyklin måtte jo grisene avlives lenge før 30-32 timer. Noen døde dessuten sjøl. Blodprøvene som har gitt C-verdiene må derfor være tatt mye tidligere enn for de som overlevde, og C-verdien har dermed hatt vesentlig mindre tid til å forandre seg ifht B-verdien.
- Uttrykket $Cx/A/B^2$ viser at høye verdier av denne responsfaktoren kan oppstå på to måter (hvis vi regner med at A-verdien er en relativt normal og stabil utgangsverdi): Ved en høy C-verdi, altså en reell økning i den aktuelle parameteren ved siste uttak; eller ved lav B-verdi, altså et vesentlig fall av denne parameteren ved sjukdomstidspunktet, i forhold til utgangsverdien. Når jeg ikke kjenner de reelle tallene bak, så lurer jeg som leser skikkelig på når det er det ene og når det er det andre som har skjedd.
- I teksten til Fig 2 står det at figuren viser resultatene i forhold til nivåene hos uninfected control. Men i figuren ser det ut som det er placebo-gruppen som er satt til relativ verdi 1.0 for alle parametrene. Og jeg antar det er to ganske forskjellige ting, for mange av parametrene.

En viktig grunn til at jeg lurer på dette er at ett av resultatene overrasker meg: Den sterke stigningen i responsparameteren for «Gammaprotein» i flere av de behandlede gruppene. Hvis jeg forstår dette uttrykket riktig, så det er Gamma-globulin det dreier seg om, så er en sterk stigning i den parameteren på et drøyt døgn overraskende, i forhold til det vi ellers er vant til. Og jeg lurer veldig på hvilke reelle tall som ligger der, bak beregningen av responsfaktoren.

Disse grisene ble jo tatt fra ved fødsel, slik at de ikke fikk colostrum. De skal derfor i utgangspunkt ha en verdi for gamma-globulin nær 0, i A-verdien. I allfall skikkelig lav. Hvordan det går med det lille som er der hos en gris som har voldsom diare, aner jeg ikke. Den taper naturligvis albumin, men om den også taper den lille mengden den evt. har i gamma-fraksjonen, har jeg ingen anelse om.

Og hvis det faktisk skjer en stigning fram til prøve C, så må det være snakk om et akuttfase-protein som faktisk ligger i gamma-fraksjonen, men som vi vanligvis ikke ser hos normale dyr som har fått råmjølk, fordi det dekkes helt av de store mengdene Immunoglobulin G som speddyret har fått fra mora.

Noen stigning i gamma-globulin slik vi er vant til å se den, på grunn av økt egenproduksjon av immunoglobuliner, kan det ikke være snakk om på så kort tid. Det tar vanligvis uker, heller enn timer.

Som konklusjon lurer jeg på om du Leon kan sende Tore Framstad og meg en fil med originaldataene for serumproteinene og de andre blodparametrene, så vi kan kikke på dem?

Til sammen er det masse erfaring med tolkning av slike blodanalysedata her på stasjonærklinikken. Tore har størst oversikt og lengst erfaring; i tillegg har vi både Thea Klem og Vibeke Rootwelt, som på ulike måter har arbeidet med blodprøver på gris.

Jeg sier ikke at din beregning av «host fold response» - parameteren er en dårlig ide, eller at det er noe galt i verdiene du har funnet. Bare at vi trenger å se på de faktiske verdiene Sentrallabben har målt, og tenke over hvordan de best skal tolkes og presenteres for leseren.

Og for øvrig, som sagt:

Jeg er skikkelig imponert !!

Mange hilsener

Tore ☺

Tore Sivertsen
Førsteamanuensis,
Inst. for produksjonsdyrmedisin,
Norges veterinærhøgskole,
Boks 8146 dep., 0033 Oslo.
Tlf. 22964937 Mobil 91628893 Fax nr. 22964762
E-post: Tore.Sivertsen@nvh.no

Fra: Cantas Leon

Sendt: 2. juni 2012 22:20

Til: Sørum Henning; Grove Søren; Thoresen Stein Istre; Framstad Tore; Sivertsen Tore; Gunnes Gjermund

Emne: Clinical treatment modeling of diarrhea in piglets 17.5 -1.6 2012 LC-HS

Kjære alle,

Vedlagt er den første utkastet av gris manuset vårt.

Jeg ser frem til å høre fra dere, ganske snart :)

Mvh

Leon CANTAS, PhD Scholar DVM
Norwegian School of Veterinary Science,
Department of Food Safety and Infection Biology,
Section for Microbiology, Immunology and Parasitology.
P.O. Box 8146 Dep. NO-0033 Oslo - NORWAY
Tel: (+47)40683725

E-post fra Tore Sivertsen til Leon Cantas, 22.10.2012, m/kopi til andre medforfattere:

Hei igjen, Leon.

Nå har jeg endelig sett ordentlig på det reviderte manuset du sendte oss allerede i august. Tore F har også sett på det, og gjort notater direkte, som jeg har brukt og i stor grad innarbeidet som kommentarer og rettinger i den vedlagte utgaven av manuset. Så du kan i hovedsak se på dette som en felles tilbakemelding.

De områdene der Tore F og jeg særlig kan bidra er i presentasjonen, tolkningen og vurderingen av de kliniske forandringene og blodprøveresultatene. De bakteriologiske resultatene og tolkningen av dem er det Henning og du som kan best.

Det første jeg vil si er at når en ser patologien, klinikken og blodprøveforandringene i sammenheng, så er dette veldig spennende resultater! Og resultatene er blitt mye klarere og tydeligere enn jeg fryktet, tatt i betraktning av hvor mye "stunt"-preg det var og måtte være over dette forsøket. Men da er det desto mer viktig at vi ikke roter til disse fine resultatene med en uklar presentasjon.

For å kunne uttrykke meg litt kort i kommentarene videre har jeg nummerert behandlingsgruppene i tabell 1 fortløpende fra 1 til 11. Altså den ikke-infiserte kontrollgruppa som 1; den infiserte, placebo-behandlede som 2; den tetracyklin-behandlede som 3; osv. til gruppa som ble behandlet med 5 mg/kg enrofloxacin, Zoolac og meloxicam som nr.11.

Hvis en først ser på oversikten over de patologiske forandringene i tarmen (spesielt epitelial nekrose, blødning og ødem histologisk, samt makroskopiske forandringer og bakterier på overflaten), som én indikasjon på den kliniske sjukdommen, så ser en følgende:

Ingen eller lite forandringer i gr. 1, som ventet. Nær normale forhold også i gruppe 5, 7, 10 og 11. Igjen som ventet: Enrofloxacin 5 mg/kg er en effektiv behandling mot coli-infeksjon, de patogene bakteriene ble drept, og dyra hentet seg inn.

Store forandringer i gr. 2, som ventet. På 5/5 dyr. Nesten like store forandringer, noe som indikerer svært dårlig effekt av behandlingen, i gr. 3 og 8. Tetracyklin har liten effekt, Zoolac aleine har liten effekt. Igjen som ventet, og veldig tydelig demonstrert.

Men i gr. 4 ser det bestemt ut til å være mindre forandringer enn i gruppe 2 og 3, og det var lite bakterier på overflaten. I denne eksperimentelle modellen synes altså Enrofloxacin å ha hatt en viss effekt selv i den lave dosen 0,03 mg/kg. Dette bør vi ikke underslå.

I gr. 6, bare meloxicam, ser behandlingen ikke ut til å ha hatt noen effekt på bakterietallet på tarmoverflaten (som ventet). Men de patologiske forandringene er kanskje noe mindre enn i gr. 2, 3 og 8. Det samme gjelder gr. 9, men den er vanskeligere å vurdere, fordi det bare er tre dyr. Dette er kanskje ikke overraskende: Meloxicam demper antakelig noe av reaksjonen også i tarmvevet, og det er den reaksjonen vi ser når dyra blir avlivet og obdusert allerede etter 24 timer.

Det er greit å ha dette som bakgrunn når en ser på forandringer i blodprøveparametrene. De er som sagt også veldig interessante, men jeg mener presentasjonen av dem fortsatt kan forenkles og gjøres tydeligere.

Utgangspunktet er de reelle tallene, slik de blir presentert i tabell S1. Denne er sentral, veldig opplysende, og bør flyttes fram som tabell 4.

Det er bare en ting jeg lurer på om kan være riktig, i denne tabellen. De angitte SEM-verdiene er veldig små. Jeg er klar over at dette er SEM og ikke SD, men siden gruppene er såpass små, skulle vel ikke det redusere verdiene med mer enn en faktor på drøyt to i forhold til SD. Og da ser det utrolig ut for meg med en SEM på 0,004 for CRP i gruppe 5, når snittet er 27,4. Eller en SEM på 0,02 i samme parameter for gruppe 10, når snittet var 100,2. Så mye individuell variasjon som det var i patologien, så må det da også ha vært større variasjon i CRP-resultatene? Sjekk denne beregningen en gang til. Hvis jeg som referee hadde fått en artikkel med slike SEM-tall, så hadde jeg blitt direkte mistenksom.

Så til de faktiske gjennomsnittsverdiene: Tallene i gruppe 1 overrasket meg ved første blikk: Det var da en forunderlig lav albumin-verdi? Hos kalver er albumin mellom 25 og 30, og jeg visste ikke at griser var så mye under. Men her var det jeg som ikke var godt nok informert. Arbeidet til Tores stipendiat Vibeke Rootwelt, som er publisert i J. Anim Sci, gir gode referanseverdier for disse parametrene hos nyfødte grisunger i dag. Og de blir ganske riktig født med en albumin rundt 2, som deretter stiger raskt i løpet av første leveuke. De andre verdiene er også nær opp til Vibekes resultater. I utgangspunktet er vi altså på trygg grunn; tallene våre for de ikke-infiserte er troverdige og gode.

I gruppe 1 viser tabellen at alle parametrene holdt seg ganske stabile, gjennom hele forsøket. Vi lyktes altså også på dette punktet; disse dyra holdt seg friske, og blodresultatene bekrefter dette, på samme måte som obduksjonsfunnene. Na, K og Cl gikk tilsynelatende litt opp mot slutten; det er også greit å ha som referanse, i forhold til de andre gruppene.

Det neste som er slående, er at alle parametrene også holdt seg ganske stabile fra startblodprøven (0h) til den som ble tatt da de begynte å vise kliniske tegn (6-8h). I alle grupper. Dette viser at den begynnende tarminfeksjonen ikke rakk å påvirke blodparametrene vesentlig, før vi så det på dyra og satte inn behandlingene. Dette kan sies med én setning i resultatene.

Det forenkler også tolkningsarbeidet vesentlig, fordi vi bare trenger å forholde oss til ett sett verdier; verdiene ved avslutning (24-32 h), når vi skal sammenligne gruppene. På denne bakgrunnen mener jeg at den statistiske beregningsmodellen ($y/x = C/B / B/A = C \cdot A/B^2$) bør kuttes ut. Det hjelper ikke at Stig har bekreftet at den er statistisk akseptabel. Den er unødvendig, og fører bare til at tolkningen blir mer komplisert. Blodprøveresultatene ved 24-32 timer kan sammenlignes direkte, slik de er. Det er mye enklere og mye bedre.

Når vi så ser på de faktiske tallene, er det første som slår en at Na-verdien ved 24-32 h har falt til under normale verdier, i gruppe 2, 3, 4, 6, 8 og 9. (Tilsynelatende litt mindre i gruppe 4 enn i de andre, men det kan være tilfeldig). Men holdt seg på normale verdier i gruppe 5, 7, 10 og 11; i tillegg til i gruppe 1. (I noen av gruppene gikk Na faktisk litt opp, akkurat som i gruppe 1). Dette er helt logisk hos griser med klinisk diaré, det er snakk om vesentlig Na-tap over tarmen. Resultatet bekrefter altså det kliniske og patologiske bildet, med hensyn på hvilke behandlinger som virket, og dermed snudde den kliniske situasjonen hos grisene. Vi ser den samme tendensen i K-verdiene, og i noe mindre grad i Cl-verdiene: Fall i gruppe 2, 3, 4, 6, 8 og 9. Normale verdier eller tendens til litt stigning (som i gruppe 1) i gruppene 5, 7, 10 og 11.

Hvis vi så ser på urea-verdiene, så ser vi at urea har steget ganske sterkt i gruppene 2, 3, 6, 8 og 9. Noe mindre i gruppe 4. Og enda mindre eller ikke i det hele tatt i gruppene 5, 7, 10 og 11. Disse urea-utslagene er i tråd med det vi ser på andre speddyr med diaré. Det er etter all sannsynlighet et uttrykk for dehydrering: Svekket nyrefunksjon av pre-renale årsaker; for lite vann til filtreringen i nyrene.

Resultatene i tabellen er egentlig så tydelig at det ikke trengs noen figur for å illustrere det. Hvis en skal gjøre det, med en figur som Fig 3 A, så er det helt greit å bruke relative verdier, med tallene i gruppe 1 som referanse. Men da må det ha skjedd noe galt i beregningen til Fig 3 A, for det åpenbare utslaget i Na (som må være stort nok til å være signifikant!) har blitt helt borte. Overskriften på denne figuren må dessuten i tilfelle ikke være "Kidney parameters", men f. eks. "Electrolytes and Urea". For det er ikke nyrene som gir fallet i Na, det er diaréen som gjør det.

Hvis en så ser på Serum-proteinene, så er det ganske riktig en stigning i mange av dem, i gruppe 2: Både i albumin, alfa-1, beta 1 og beta 2 (CRP kommer jeg tilbake til). Det samme gjentar seg i gruppene 3, 4 (kanskje litt svakere), 6, 8 og 9. Mens stigningen er atskillig mindre eller mangler helt i gruppene 5,7, 10 og 11. Dette gjelder særlig albumin, men også flere av de andre. Dette er interessant. Jeg tror en bør påpeke i diskusjonen at en del av stigningen i de klinisk rammete gruppene kan være et resultat av dehydreringen. Dehydrering fører til hemokonsentrasjon, og det vil gjøre at verdiene i g/L går opp. Siden resultatene varierer litt for de ulike proteinene, er det neppe bare hemokonsentrasjon det er snakk om. Noe reaksjon i akutfaseproteiner kan være med i dette bildet. Men det er iallfall en observasjon i dette forsøket at de fleste av disse samleverdiene for serumproteinfraksjoner langt på vei blir normalisert av den effektive behandlingen, i likhet med de patologiske forandringene i tarmen, elektrolyttverdiene og urea-verdiene. Det må komme fram i diskusjonen. Jeg er samtidig enig i at beta 2-verdien ser ut til å være et unntak, slik det er antydnet i manuset. Den holder seg relativt høyt, også i gruppe 5, 10 og 11. Til dels også i gruppe 7. (Jfr. kommentar under).

Jeg tror igjen at tabellverdiene i hovedsak taler for seg sjøl. Hvis en skal illustrere dem med en figur, så kan en gjøre det med en figur som 3 B. Men igjen bør en da simpelthen bruke verdien for 24-32 h i gruppe 1 som referanse. Jeg tror egentlig at hele figur 3 kan droppes, og bare erstattes med en påpekning av den kraftige stigningen for CRP fra gruppe 1 til gruppe 2 (se under).

Når en så går til CRP, ser en et helt annet bilde enn for albumin og de fleste andre serumproteinene: Normalverdien, i gruppe 1, holder seg stabilt på 0,1. I den infiserte, ubehandlede gruppa stiger verdien til 2,5; altså mer enn 20 ganger. Et lignende nivå ser vi i gruppe 8. I gruppe 9 stiger den svakere enn i placebo-gruppa. I gruppe 3 (Tetracyklin) stiger den ikke i det hele tatt; så her er det tegn på direkte hemning. Virkelig interessant.

Men i de øvrige behandlede gruppene stiger CRP, som det ganske riktig er påpekt i manuset, mer enn i placebo-gruppa. Resultatet for gruppe 6 er litt overraskende, sammenlignet med gruppe 9. Men den aller største stigningen er i de mest effektivt behandlede gruppene: gr. 5, (7), 10 og 11. Dette er helt riktig framhevet i manuset, men det kan gjøres enda klarere ved å rydde opp i omtalen av de andre serumproteinene. Når beta 2 tenderer til å vise resultater som er litt parallelle med (men mye mindre uttalt enn) CRP, så kan vel det også stemme: CRP ligger så vidt jeg veit vanligvis i beta-fraksjonen hos andre dyr. Kanskje CRP faktisk ligger i beta 2 hos gris? Det kan kanskje Stein svare på? I så tilfelle stemmer det jo helt.

Dette resultatet er så interessant at jeg er helt enig i at det bør framheves. Figur 4 b (s.44) synes jeg derfor det er grunn til å beholde, mens figur 4 a (s. 43) kan droppes. Og i figur 4 b kan en godt bruke resultatet for placebo ved 24-32 h som referanse. Men jeg ville gjøre skalaen litt større, slik at det blir synlig at totalprotein, albumin, alfa 1 m.fl. tenderer til å bli mindre (altså normaliseres) i gruppe 5, 7, 10 og 11, mens CRP altså blir dramatisk større. For å få med det høyeste CRP-utslaget (gruppe 10) i skalaen kan en bryte skalaen for denne verdien. (Sjøl om jeg ikke veit hvordan en gjør det med datateknikk. Akkurat det var enklere med gammeldags tegning av figurene).

I den vedlagte versjonen av manuskriptet har jeg også ført inn en del andre kommentarer og forslag til rettinger, fra Tore F og fra meg.

Beklager igjen at du måtte vente så lenge på denne gjennomgangen, og disse kommentarene!
Det har som sagt gått litt stritt for seg med klinikkarbeid og annet i høst. Men det er ingen unnskyldning, særlig ikke overfor deg, som faktisk kjører praksis ved siden av dette arbeidet med forskninga di.

Lykke til med manuset !

Hilsen Tore S. , med mange innspill og god hjelp fra Tore F.

Tore Sivertsen
Førsteamanuensis,
Inst. for produksjonsdyrmedisin,
Norges veterinærhøgskole,
Boks 8146 dep., 0033 Oslo.
Tlf. 22964937 Mobil 91628893 Fax nr. 22964762
E-post: Tore.Sivertsen@nvh.no

Fra: Sivertsen Tore
Sendt: 17. oktober 2012 17:31
Til: 'Leon Cantas'
Emne: SV: ETEC gris

Hei igjen, Leon.

Ja visst, du har helt rett. Beklager rotet fra min side.

Og beklager enda mer at du ikke har fått svar før. Det har tydeligvis gått litt for hektisk for seg for meg i høst fram til nå, men det er en dårlig unnskyldning.

Jeg har fortsatt en del innspill til manuset. Skal jobbe med det ordentlig, så du får et skikkelig svar i løpet av denne uka.

Bedre seint enn aldri, forhåpentligvis.

Med skamfull hilsen

Tore

Tore Sivertsen
Førsteamanuensis,
Inst. for produksjonsdyrmedisin,
Norges veterinærhøgskole,
Boks 8146 dep., 0033 Oslo.
Tlf. 22964937 Mobil 91628893 Fax nr. 22964762

E-post: Tore.Sivertsen@nvh.no

Fra: Leon Cantas [<mailto:leoncantas@gmail.com>]

Sendt: 16. oktober 2012 12:42

Til: Sivertsen Tore

Emne: Fwd: ETEC gris

Til info!

----- Forwarded message -----

From: **Leon Cantas** <leoncantas@gmail.com>

Date: 2012/8/23

Subject: ETEC gris

To: Sørum Henning <henning.sorum@nvh.no>

Cc: Tore.Sivertsen@nvh.no, Tore.Framstad@nvh.no

Hei,

Takk for et meget spennende møte i dag. Vedlagt er det siste utkast til gris manuset vårt som har sendt på den 21/08 til dere.

Mitt journal valg er AAC <http://aac.asm.org/site/misc/about.xhtml>

Studien kan sendes inn som en 'full-length research article'

Mvh

Leon