

Tore Sivertsen
Førsteamanuensis, Institutt for produksjonsdyrmedisin,
Fakultet for veterinærmedisin og biovitenskap,
NMBU.

Fortrolig

Til rektoratet
og dem som for øvrig er involvert i saken.

13.08.2014

Fusk med CRP-resultatene i manuskriptet: "Impact of antibiotic, probiotic and NSAID treatments on the expression of the *tra* genes of an R plasmid and on the host innate immune activity during colibacillosis in piglets" (artikkel V) i Leon Cantas' doktorarbeid –

Tilleggskommentar til utredningen fra Aage Tverdal datert 15.10.2013.

Undertegnede er en av medforfatterne i det aktuelle artikkel-manuskriptet. Jeg er klar over at det nå er en ny, uavhengig gruppe som arbeider videre med spørsmålet om mistenkt forskningsfusk fra Leon Cantas' side. Ved samtale med en av de andre medforfatterne for en stund siden ble jeg imidlertid oppmerksom på at ikke alle involverte har forstått hvor grov fusk og manipulering Cantas faktisk gjorde seg skyldig i under behandlingen og presentasjonen av CRP-resultatene i denne artikkelen. Ved ny gjennomlesning av Tverdals for øvrig gode og grundige utredning fra 15.10.13 ser jeg at det ikke framgår klart hvor grovt fusket er, og at noe av grunnen til det kan være at Aage Tverdal ikke sjøl var involvert i forsøkene. Det virker derfor som han ikke har oppdaget at Cantas i tillegg til å overdrive og forstørre resultatene på uredelig vis, har formet resultatene etter eget ønske ved å bytte om på gruppene. De "resultatene" han deretter forstørret ytterligere i det ferdige manuskriptet, var derfor i utgangspunktet helt oppkonstruerte.

I figuren bakerst i regnearket utarbeidet av Cantas (Vedlegg a til Tverdals utredning) er det to grupper som skiller seg kraftig ut i «Host fold response (HF)», og får høye verdier målt relativt til Placebo: Gruppe 3 (med HF relativt til Placebo på 16,76) og gruppe 8 (med HF relativt til Placebo på 12,67). I utredningen påpeker Tverdal at den første stemmer godt med resultatet fra regnearket, mens den siste verdien er høyere enn det framgår av regnearket, men Tverdal mener dette kan være en regnefeil. Uansett er det riktig at beregningene i regnearket gir de høyeste gjennomsnittlige HF-verdiene i gruppe 3 (Gris 3.1.1 – 3.5.3) og i gruppe 8 (Gris 8.1.1 – 8.5.3). I figuren bakerst i regnearket har disse to høye søylene fått betegnelsene «Høyt baytril zoo» (gr. 3) og «høyt Baytril» (gr. 8). Problemet er imidlertid at dette ikke var de behandlingene gr. 3 og gr. 8 fikk.

Vi var fire personer involvert i disse forsøkene (Cantas, Sørum, Framstad og undertegnede), og alle hadde oversikt over rekkefølgen på behandlingsgruppene. Den var: 0: Kontroll. 1:

Placebo. 2: Terramycin. **3: Lav Baytril (< MIC)**. 4: Høy Baytril (> MIC). 5: Metacam + placebo. 6: Metacam + høy Baytril. 7: Zoolac + placebo. **8: Zoolac + Metacam**. 9: Zoolac + høy Baytril. 10: Zoolac + høy Baytril + Metacam. Det er også i denne rekkefølgen gruppene er plassert i tabeller og figurer i den ferdige artikkelen. I figuren i regnearket er imidlertid gruppene plutselig byttet om, slik at behandling med høy Baytril havner på de to gruppene med høy HF. Når en vet at en av de interessante hypotesene før arbeidet (basert på tidligere resultater i zebrafisk) var at infeksjon + effektiv antibiotikabehandling kanskje ville gi større respons i akutfaseprotein enn bare infeksjon, så er det knapt mulig å trekke andre slutninger enn at denne ombyttingen er gjort bevisst.

I neste omgang; ved presentasjonen av resultatene i artikkelmanuset, forstørret så Cantas disse manipulerte forskjellene i "HF-respons" – verdier ytterligere, slik at de ble enda mer dramatiske.

Figurene som ble laget på grunnlag av dette var de første resultatene vi som medforfattere mottok fra Cantas, i juni 2012. Vi kjente ikke til noe av manipulasjonen som lå bak søylediagrammene. Personlig hadde jeg på det tidspunkt ingen mistanke om fusk, og tok derfor diagrammene for god fisk. Jeg var imidlertid helt oppmerksom på at "HF-respons" var en avledet parameter, og påpekte flere problemer og fallgruver ved bruken av en slik avledet parameter. Det var også noen andre resultater jeg undret meg litt over. For å kunne bidra i vurderingen av alt dette ba jeg Cantas, i en mail med kommentarer til utkastet (datert 8. juni 2012, og sendt med kopi til de andre medforfatterne) om å sende en fil med de originale dataene fra Sentrallaboratoriet til Tore Framstad og meg. Dette var ikke fordi jeg hadde mistanke om noe galt. Jeg var tvert i mot imponert over at han hadde jobbet så effektivt, og ga han skryt for det. Det var bare ut fra en oppfatning om at vi med vår erfaring trolig kunne bidra i vurderingen av originalresultatene.

Vi mottok aldri originaldataene fra Cantas. Men i neste manuskriptutkast, som vi mottok i august 2012, inkluderte Cantas (tilsynelatende) en oversikt over disse grunnlagstallene; i den tabellen som står som **Supplementary material 2** til artikkel V i avhandlingen (plassert sist i artikkel V; rett før art. VI). Det var da, naturlig nok, disse resultatene jeg baserte meg på i videre kommentarer til artikkelutkastet, høsten 2012.

Da vi som medforfattere, etter å ha blitt varslet om mistanken om fusk i Cantas' arbeid, den 16.10.2013 mottok kopi av Aage Tverdals utredning, var det for meg ikke Tverdals konklusjoner som var det største sjokket. Det største sjokket var å se tabellene over de faktiske originalresultatene fra Sentrallaboratoriet, som vi altså hadde bedt om i juni 2012, men aldri mottatt. Grunnen til at jeg ikke hadde mast mere om det, var at vi jo hadde mottatt den omtalte samletabellen, som står i avhandlingen. Men da jeg så originaltallene, oppdaget jeg umiddelbart at det ikke var noen som helst forbindelse mellom originaltallene og den samletabellen vi hadde fått av Cantas, og at alle påstandene om interessante gruppeforskjeller i CRP-respons i dette forsøket var fullstendig uten grunnlag.

For å tydeliggjøre poenget, har jeg under satt opp CRP-resultatene for de ulike gruppene; slik de kommer ut av det opprinnelige materialet fra Sentrallaboratoriet, slik de står i det regnearket Aage Tverdal vurderte, og slik de står i resultat-tabellen i artikkelen. (Snitt og SEM. Snittverdiene er uthevet.)

CRP, mg/L. Beregnet av meg, ut fra originaltallene fra Sentrallaboratoriet:

Gruppe	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Behandl.	Kontr	Plac.	Terr.	Baytr. < MIC	Baytr. > MIC	Met- acam	Met.+ Ba>M	Zool.	Zool +Met	Zool+ Ba>M	Zo+Me +Ba>M
Tidsp.A: Snitt	0,28	0,08	0,13	0,06	0,06	0,14	0,06	0,14	1,83	0,13	0,20
SEM	0,16	0,03	0,09	0,04	0,04	0,05	0,02	0,09	1,07	0,09	0,06
Tidsp B: Snitt	0,40	1,38	0,35	0,08	1,04	.	1,06	1,36	0,53	0,53	0,30
SEM	0,06	0,49	0,35	0,03	0,32	.	0,20	0,48	0,13	0,20	.
Tidsp C: Snitt	3,38	5,75	1,10	1,76	3,33	2,65	2,40	1,66	1,26	1,95	2,67
SEM	0,56	4,66	0,40	0,57	0,95	1,12	0,44	0,52	0,40	0,91	0,71

Ved en enkel inspeksjon av disse tallene er det to åpenbare konklusjoner:

For det første at CRP-verdier gjennomgående har steget fra start (Tidsp. A, v/fødsel) til avslutning (Tidsp C, 24-32 h.). (Den høye startverdien i gruppe 8 kommer fra en enkelt outlier.)

For det andre at det ikke er noen av de behandlete gruppene bortsett fra placebo der CRP-verdiene ved avslutning er høyere enn for kontrollgruppa. (Det høye snittet i placebogruppa kommer for øvrig også fra en enkelt outlier på 19,7 mg/L. Derfor den store SEM-verdien.)

CRP, mg/L. Fra regnearket til Leon Cantas, kopiert fra Tverdals utredning:

Gruppe	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Behandl.	Kontr	Plac.	Terr.	Baytr. < MIC	Baytr. > MIC	Met- acam	Met.+ Ba>M	Zool.	Zool +Met	Zool+ Ba>M	Zo+Me +Ba>M
Tidsp.A: Snitt	0,35	0,12	0,16	0,12	0,12	0,17	0,12	0,20	1,52	0,18	0,20
SEM	0,15	0,02	0,06	0,02	0,02	0,04	0,01	0,07	0,87	0,05	0,06
Tidsp B: Snitt	0,40	1,36	0,70	0,10	1,04	0,5	1,06	1,36	0,52	0,53	0,43
SEM	0,08	0,45	0	0	0,31	0	0,20	0,48	0,10	0,18	0,11
Tidsp C: Snitt	3,38	5,75	1,10	1,76	3,31	2,65	2,40	1,66	1,26	1,95	2,67
SEM	0,79	3,21	0,40	0,56	0,73	0,86	0,43	0,51	0,39	0,80	0,74

Sammenligner en disse tallene med tabellen over, ser en at resultatene bare er moderat forandret, til tross for de omfattende imputeringene av tall som Tverdals har påpekt. Den åpenbare konklusjonen; at det ikke er noen vesentlig større stigning i CRP ved avslutning i noen av de behandlede gruppene enn i kontrollgruppa, er den samme. Hovedkonsekvensen av imputeringene var derfor egentlig at de muliggjorde beregning av "HF-respons" for alle grupper; noe som ellers ville vært umulig pga ufullstendigheten i materialet.

CRP, mg/L. Fra tabellen i avhandlingen (Art. V, Supplementary material 2):

Gruppe	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Behandl	Kontr	Plac.	Terr.	Baytr · < MIC	Baytr · > MIC	Met- acam	Met.+ Ba> M	Zool.	Zool +Me t	Zool+ Ba>M	Zo+Me + Ba>M
Tidsp.A: Snitt	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,11	0,11	0,11	0,12
SEM	0,00 2	0,00 4	0,00 8	0,00 6	0,00 2	0,00 3	0,002	0,00 4	0,04	0,02	0,04
Tidsp B: Snitt	0,1	0,1	0,12	0,1	0,12	0,32	0,12	0,12	0,12	0,13	0,13
SEM	0,00 1	0,00 4	0,00 6	0,00 2	0,00 4	0,2	0,002	0,00 2	0,03	0,04	0,01
Tidsp C: Snitt	0,1	2,5	0,1	5,3	27,4	12	12	1,66	0,76	100,2	36,6
SEM	0,00 4	0,13	0,00 8	0,00 6	0,00 4	0,00 2	0,004	0,00 4	0,04	0,02	0,7

Ved sammenligning av denne tabellen med de to over, er det åpenbart at nesten alle tallene i denne ferdige tabellen simpelthen er oppdiktet. Blant tallene for tidspunkt B er det ett snitt-tall som er i nærheten av virkeligheten; tallet for gruppe 3. Ved tidspunkt C er snitt-tallet for gruppe 7 i overensstemmelse med de reelle resultatene, men det er også det eneste. Alle de øvrige snitt-tallene ved tidspunktene B og C er konstruerte, og de er konstruert på en slik måte at de viser en dramatisk effekt i tråd med Cantas' forhåndshypotese: At CRP-nivået i infisert, ubehandlet gruppe (Placebo) ville stige mer enn i de ikke-infiserte kontrolldyra; og at CRP-nivåene i de gruppene som fikk effektiv antibiotikabehandling (Baytr > MIC) ville stige mer enn hos de infiserte, ubehandlede dyra. SEM-verdiene er også helt oppdiktete, og i stor grad usannsynlig små.

Dette er ikke bare snakk om en viss grad av fusk for å forbedre utseende eller signifikans i resultatene. Dette er simpelthen svindel; ren oppkonstruering av resultater som det ikke finnes antydning til i de reelle dataene.

I tilbakeblikk er det to spørsmål som melder seg, iallfall for meg:

Det første er hvorfor Cantas, etter å ha gjort seg alt bryet med å innføre den avledete parameteren "Host fold response" (som gir et inntrykk av variasjon i CRP-responsen som ikke er der i utgangspunktet), imputere tall slik at HF kunne beregnes for alle grupper, og så bytte om på gruppene for å få resultatene til å passe med hypotesen - deretter unnlot å bruke de figurene og resultatene han hadde laget på denne måten, og i stedet forstørret resultatene ytterligere. Samt innførte noen SEM-verdier som var så små at de var åpenbart usannsynlige. Hadde han gjennomført fusket etter det opplegget som lå i regnearket, laget

nye ”originale” CRP-verdier i tråd med det, og holdt seg til noenlunde sannsynlige SEM-verdier, ville svindelen kanskje ikke ha blitt oppdaget.

Jeg har forstått det som Cantas nå har forlatt landet, er vanskelig å få kontakt med, og ikke har villet kommentere kritikken utover en avvisning av alle anklager om fusk. Det er derfor mulig at en aldri vil få noe svar på dette spørsmålet.

Det andre, og vel så alvorlige spørsmålet, er hvordan Cantas kunne lykkes med denne svindelen så langt som han gjorde. Den ble jo faktisk ikke stanset før en våken tredjeperson reagerte på SEM-verdiene i samletabellen, under Cantas’ disputas. Og deretter skaffet seg originaldataene, for å sjekke. Hvorfor lot alle medforfatterne seg lure, så lenge som vi gjorde?

Her kan jeg bare svare for meg sjøl. Jeg var med og diskuterte planene før forsøket ble startet, var med på den praktiske delen av forsøket, og fikk deretter artikkelutkast oversendt fra Cantas, som jeg ga mine kommentarer til. Leon Cantas framsto som en sjarmerende, engasjert og hardt arbeidende mann. Han virket også sjølbevisst, litt egenrådig, og arbeidet svært raskt. Jeg hadde et inntrykk av at han kanskje ikke tok det veldig nøye med å kappe en sving her og der, men kom ikke på tanken om at han var direkte uærlig. Henning Sørum, som var hans hovedveileder, ga også uttrykk for at Cantas ikke bare var rask og effektiv, men meget dyktig. Og opplegget virket kurant nok. Rollen til Tore Framstad og meg var å delta i og vurdere den kliniske delen, og blodprøvene skulle analyseres av Sentrallaboratoriet. Jeg hadde derfor ingen følelse av at det var noe galt, i utgangspunktet.

Da vi fikk det første artikkelutkastet i juni 2012, noen få måneder etter gjennomføringen av forsøket, inneholdt det som nevnt ikke oversikt over selve blodprøveresultatene; bare figurer som viste ”HF respons”. Jeg ga som nevnt uttrykk for at jeg syntes denne avledete parameteren hadde en del svakheter, og ba om å få tilsendt en fil med originaltallene. At Cantas ikke responderte på det, men i stedet presenterte den omtalte samletabellen i den neste utgaven av artikkelmanuset, tok jeg som uttrykk for hans egenrådighet og måte å arbeide på. Det falt meg bare ikke inn at tallene i samletabellen simpelthen kunne være oppdiktet.

Jeg reagerte riktignok på de usannsynlig lave SEM-verdiene, og skrev faktisk i min kommentar (den 22.10.2012) at ”*Hvis jeg som referee hadde fått en artikkel med slike SEM-tall, så hadde jeg blitt direkte mistenksom*”. Jeg var likevel naiv nok til å anta at dette dreide seg om en beregningsfeil, og ba Cantas gå gjennom beregningene en gang til. Som det framgår av de vedlagte kopiene av mine mailer til Cantas og de andre medforfatterne, var jeg for øvrig imponert over resultatene, la ganske mye arbeid i å kommentere dem, og hadde åpenbart ingen egentlige mistanker om fusk. Jeg hørte ikke mer før artikkelen var innsendt og avhandlingen levert.

I ettertid angrer jeg naturligvis på at jeg ikke reagerte med reell mistanke da jeg så de usannsynlige SEM-verdiene, høsten 2012. Jeg kunne jo ganske enkelt gått til Stein Istre Thoresen, som også var medforfatter, og bedt han skrive ut en fil med originaldataene. Da hadde svindelen blitt avslørt et år tidligere enn den gjorde, og NVH / NMBU hadde sluppet den vanskelige situasjonen at Cantas faktisk har fått trykt sin avhandling og disputert med forskningsmateriale der denne svindelen er inkludert.

At jeg gjorde denne feilen, tror jeg beror på flere ting. Den første er at jeg aldri tidligere har opplevd denne typen fusk med forskningsresultater. Jeg var simpelthen for naiv til å forestille meg en slik svindel. Det andre var at vi var flere forskere involvert, og jeg opplevde andre som mer sentrale enn meg. Dermed ble det en slags pulverisering av ansvaret, selv om jeg ikke bevisst tenkte på den måten. Jeg hadde jo også gitt ganske grundige kommentarer, ut fra de resultatene jeg hadde sett. Og det er alltid mye annet å gjøre, som krever oppmerksomheten. Det bidro for eksempel til at jeg ikke fikk gått gjennom manuset fra august og gitt mine kommentarer før i oktober 2012. Når Cantas ikke svarte på mine kommentarer, tok jeg det mest som uttrykk for hans egenrådighet. Dessuten var han jo i annet arbeid, så jeg regnet med at han også hadde det travelt.

For meg har denne saken vært en solid lærepenge. Jeg vil tro den har vært det også for flere av de involverte, og jeg håper vi ikke lar oss lure like lett, hvis vi skulle komme ut i en liknende situasjon. For NMBUs skyld håper jeg naturligvis at vi slipper å oppleve noe slikt igjen, men dette tilfellet har vist at det er nødvendig å være obs. Noen forskere kan faktisk finne på å konstruere sine resultater.

Om Cantas har gjort seg skyldig i flere tvilsomme manipulasjoner med data, i det øvrige arbeidet han har gjort, vet jeg naturligvis ikke noe om. Men frekheten i svindelen med disse CRP-resultatene gir meg en ubehagelig følelse av at dette kan han også ha gjort tidligere. Tiden får vise hva de videre undersøkelsene kommer fram til i så måte. Men siden jeg oppdaget at ikke alle medforfatterne hadde forstått hvor utvilsom og grov svindelen med CRP-resultatene var, og at Tverdals grundige, men forsiktige kommentarer tydeligvis ikke hadde gjort det helt klart, fant jeg det riktig å skrive dette notatet.

13.08.14 Tore Sivertsen

Vedlegg: Kopi av tekst i svar-mailer fra meg til Leon Cantas, med kommentar til artikkelutkastene; datert den 08.06.2012 og 22.10.2012.

Tekst i mail fra meg til Leon Cantas (med kopi til andre medforfattere) datert 08.06.2012:

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 bearbeidete utkastet 2. juni.

I mellomtiden, siden februar, er det viktigste av labb-arbeidet gjort, resultatene bearbeidet, 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...

Dernest:

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 amatørers 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 : $C/B / B/A = Cx A/B^2$. 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/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 akutfase-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 blodanalyser 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

Tekst i mail fra meg til Leon Cantas (med kopi til andre medforfattere) datert 22.10.2012:

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 blick: 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