

Gjennomgang av to vitenskapelige arbeider av Leon Cantas som utgjør en del av hans PhD (2013) med tittel: *Development of antimicrobial drug resistance - Impact of the bacterial infection treatment.*

Paper II: *Impact of antibiotic treatments on the expression of the R plasmid tra genes and on the host innate immune activity during pRAS1 bearing Aeromonas hydrophila infection in zebrafish (Danio rerio).* Cantas L., Midtlyng P.J. and Sørum H. (2012). BMC Microbiol 12:37.

Paper IV: *Impact of antibiotics on the expression of the tra genes and on the host innate immune gene activity during SXT element bearing Aeromonas salmonicida infection in Atlantic salmon (Salmo salar L.).* Cantas L., Roux F.L., Mazel D. and Sørum H. (manuskript).

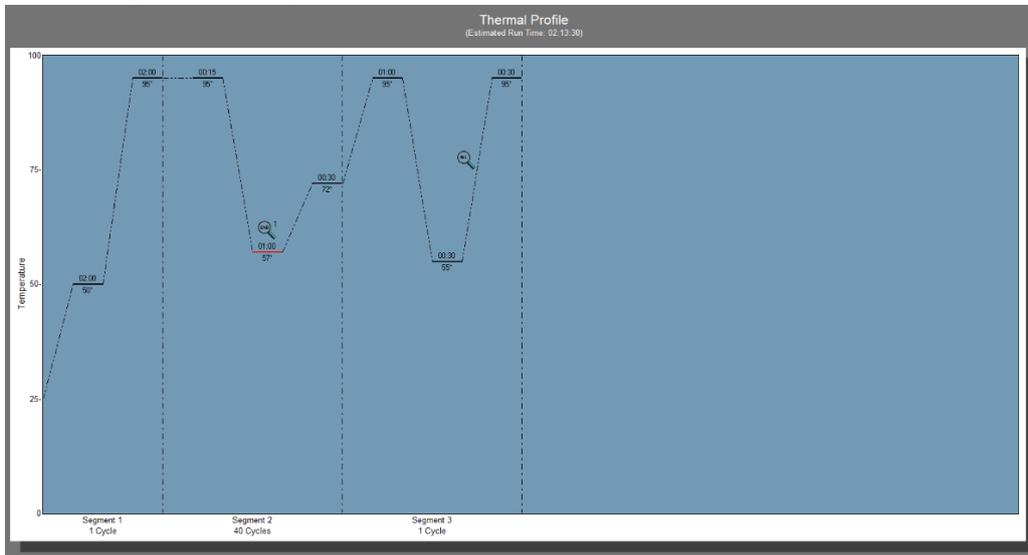
Jeg har kronologisk gått gjennom begge arbeider (papers) og tatt for meg alle tabeller og figurer. I Paper II er det én primertabell og fem figurer og i Paper IV er det én primertabell og tre figurer. Alle figurer, bortsett fra figur 1 i Paper II, er ekspresjonsdata fra real-time qPCR kjøringene. I backup-mappene fra IT og en gammel PC som har vært koblet til en av real-time PCR maskinene fant jeg til sammen fem ulike real-time qPCR kjørefiler (MxPro filer). Den ene ser ut til å være en defekt kjøring mens de fire andre har amplifikasjonsplots. Jeg fant også en tekstfil som ser ut til å være en eksport av Ct-verdier fra en av kjøringene, og flere Excel ark med data fra real-time qPCR, noen med Ct-verdier, og analyser for alle figurer i begge paperene. Jeg har gått gjennom analysene og de ser ut til å være korrekte. Det eneste jeg ikke fant var de endelige boxplottene i Paper IV, men jeg fant beregninger og stolpediagrammer i Excel arkene som samsvarer med dataene i plottene. Det er mulig de endelige boxplottene er lagd i et annet program. Jeg fant ellers også dokumenter, både elektronisk og i håndskrevet form på hvordan man analyserer real-time qPCR data, beregner standard avvik ol., bruk av referansegener og normalisering. Jeg finner noen Ct-verdier i Excel arkene med fullstendige ekspresjonsanalyser. PCR-brønnene er ikke merket med target navn (ikke uvanlig siden dette tar tid, jeg pleier heller ikke å gjøre det) og dette gjør det vanskelig å avgjøre hvilke Ct-verdier som er brukt i hvilket manuskript, eller hvilket Excel-ark de tilhører. I tillegg er kjørefilene ikke lagret etter at de er analysert i MxPro, dvs. jeg vet ikke hvilken *threshold* og *baseline* som er benyttet, om han har benyttet den innebygde MxPro-algoritmen i analysene eller om det er gjort manuelt. Fra smeltepunktskurvene fra real-time qPCR kjøringene (alt er kjørt med SYBR) virker de å være mot flere targets, som er i samsvar med resultater i bla. Paper II og Paper IV. Det er ikke uvanlig at man ikke lagrer den endelige analysen siden det er fort å gjøre det på nytt, og man kan se hva som kom rett ut fra kjøringen (men man kan lagre analysen som ny fil). Ellers virker analysene jeg ser i Excel arkene grundige. Han har også bakkett opp dataene over flere foldere. Med hjelp fra Aud Kari har vi funnet primerstokkløsninger som det er henvist til i Paper II.

- Nedenfor er det vist vinduer fra én real-time qPCR kjøring (slik de ser ut når man åpner fila, altså ikke analysert). I resten av dokumentet har jeg tatt for meg alle åtte figurer og en av tabellene. Figurene er linket opp mot data og analyser i Excel arkene jeg har funnet.

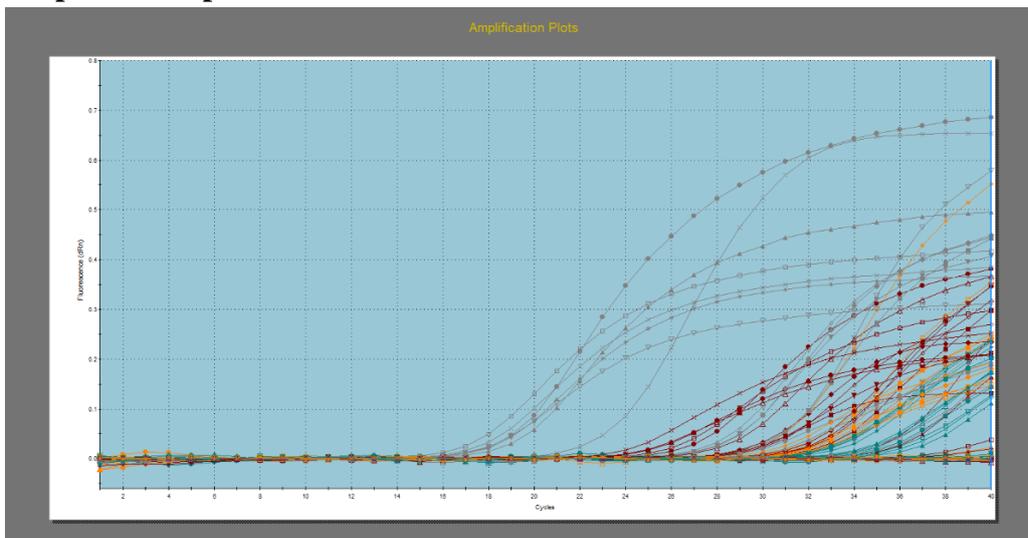
Plate setup:

All	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unknown SYBR	Unknown REF										
B	Unknown SYBR	Unknown REF										
C	Unknown SYBR	Unknown REF										
D	Unknown SYBR	Unknown REF										
E	Unknown SYBR	Unknown REF										
F	Unknown SYBR	Unknown REF										
G	Unknown SYBR	Unknown REF										
H	Unknown SYBR	Unknown REF										

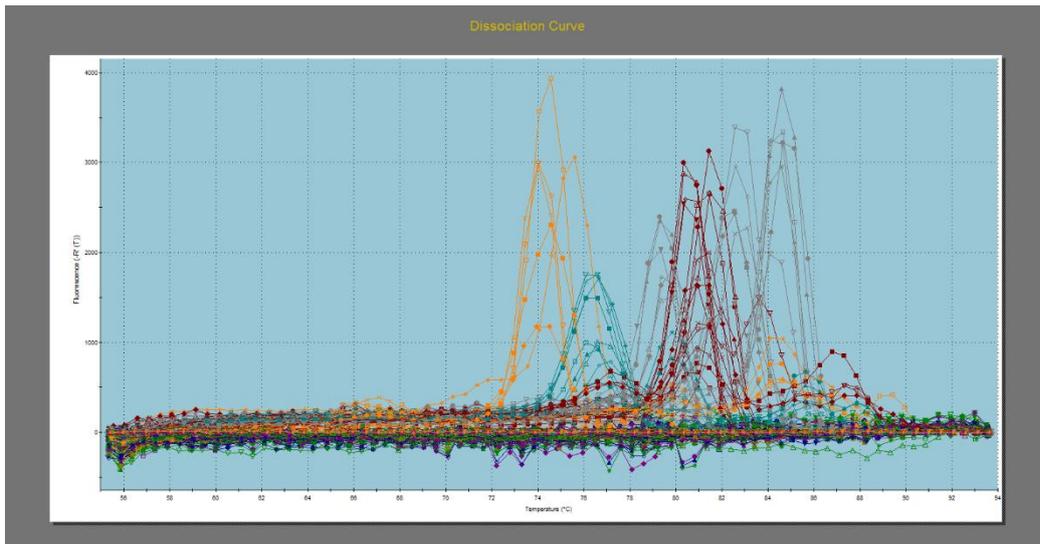
Thermal profile setup:



Amplification plot:

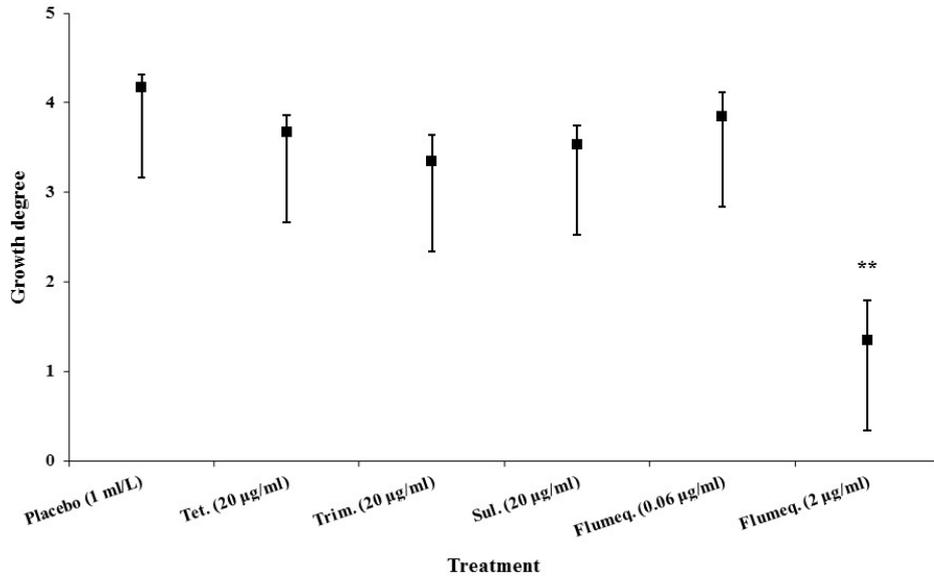


Dissociation curve(s) (smeltepunktskurve, ser bla. ut til å være flere targets):



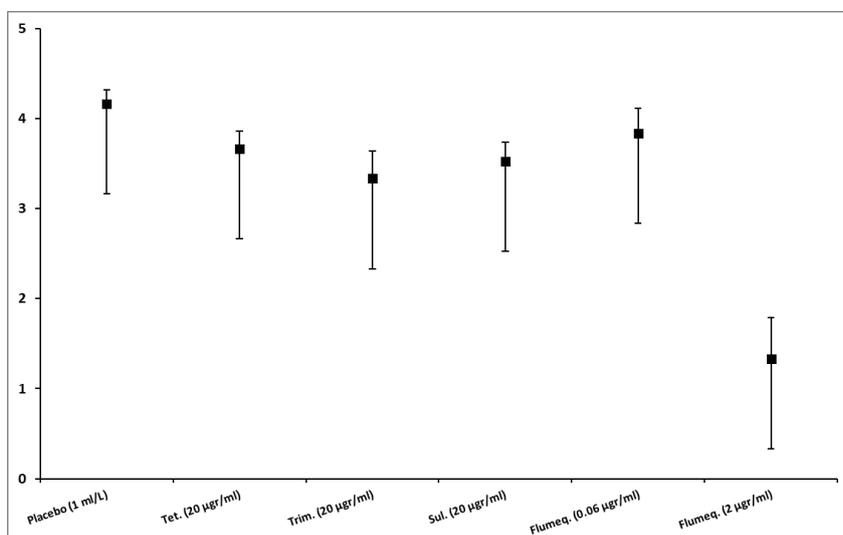
Paper II: *Impact of antibiotic treatments on the expression of the R plasmid tra genes and on the host innate immune activity during pRAS1 bearing Aeromonas hydrophila infection in zebrafish (Danio rerio).* Cantas L., Midtlyng P.J. and Sørum H. (2012). BMC Microbiol 12:37.

Figur 1:

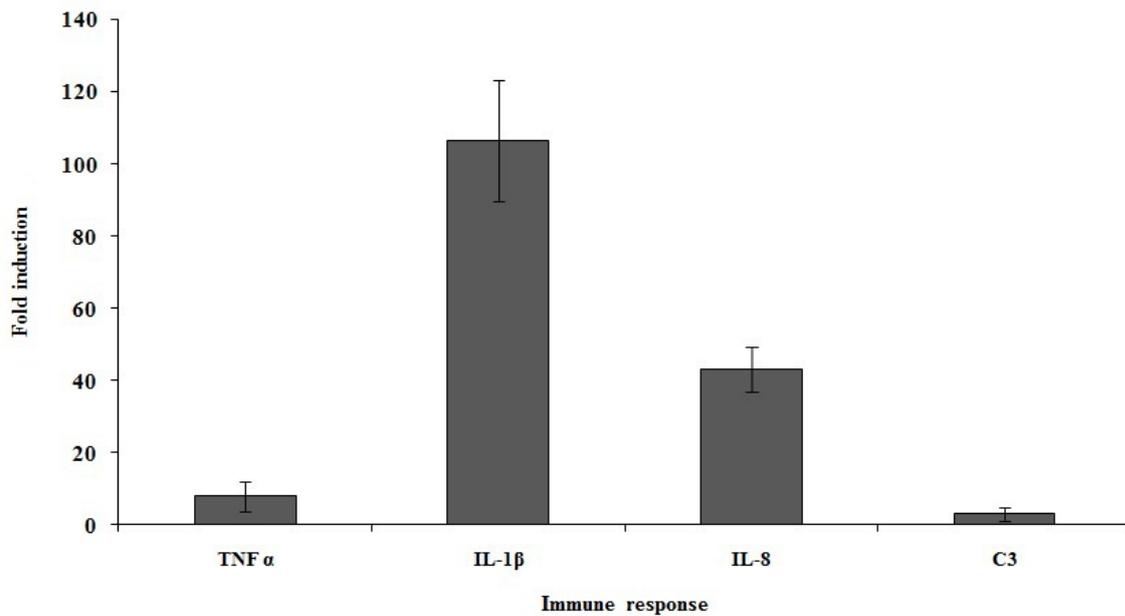


Over er figur 1 i Paper II. **Nedenfor** er en tabell og et diagram fra Excel ark som ser ut til å være de samme dataene.

	sdH2O	Placebo (1 ml/L)	Tet. (20 µgr/ml)	Trim. (20 µgr/ml)	Sul. (20 µgr/ml)	Flumeq. (0.06 µgr/ml)	Flumeq. (2 µgr/ml)
1	0	4	4	4	3	3	1
2	0	4	3	4	4,14	4	0
3	0	4	4	2	3	4	2
4	0	4	3	3	3	3	2
5	0	5	4	4	4	5	3
6	0	4	4	3	4	4	0
average	0	4,166666667	3,666666667	3,333333333	3,523333333	3,833333333	1,333333333
SD	0	0,372677996	0,471404521	0,745355992	0,525409893	0,687184271	1,105541597
SEM	0	0,152736884	0,193198574	0,305473767	0,215331923	0,281632898	0,453090818



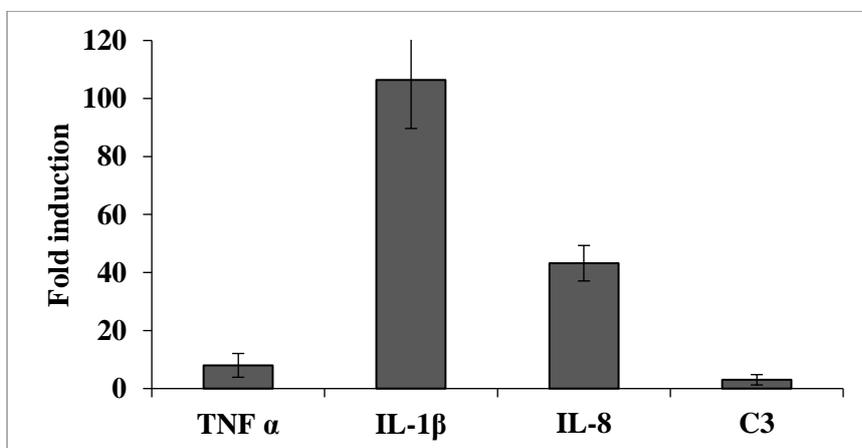
Figur 2:



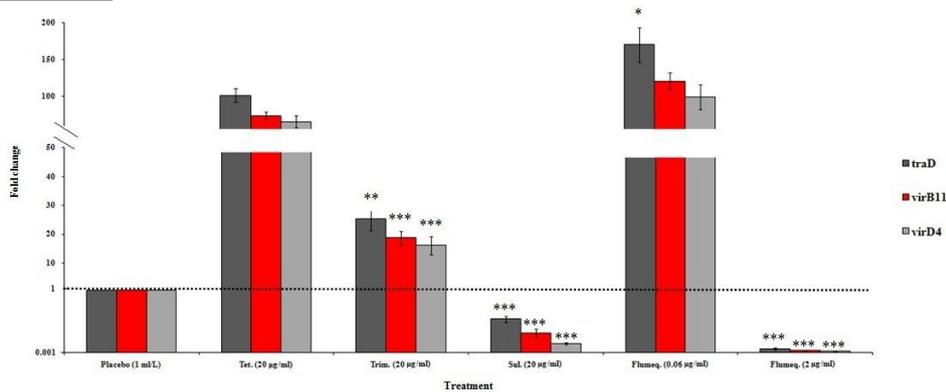
Over er figur 2 i Paper II. **Nedenfor** er et par tabeller og et diagram fra Excel ark som ser ut til å være de samme dataene. Fant også stokkløsninger med TNF α -primere der sekvenser matcher de i paperen.

sdh20	Mean
TNF α	8
IL-1 β	106,3984507
IL-8	43,21119828
C3	3,031433133

	1	2	3	1	2	3	Mean	SD	SEM	SD 2*	SEM 2*	TNF α	Mean	TNF α
TNF α	-1.2	-4.1	-0.8	3.2	3	2.8	8	0.163230	0.647309	1.138865	1.56244413	TNF α	8	TNF α
IFN γ	0.68	-2.3	0.54	1.5	1.1	0.54	1,046666667	0.393729	0.759413	1.313784	1.692801707	IFN γ	2,065751	IFN γ
INOS	0.8	-3.2	0.009	0.8	1.2	1.1	1,033333333	0.169967	0.650308	1.125033	1.569503331	INOS	2,046748	INOS
duox				6.2	7.2	6.8	6,733333333	0.410961	0.768538	1.329571	1.70542819	duox	106,3985	IL-1 β
pglyrp5				4.9	4.7	5.2	4,933333333	0.30548	0.660515	1.133007	1.587333765	pglyrp5	30,55493	pglyrp5
pglyrp6				4.9	4.7	5.9	5,166666667	0.524934	0.811715	1.438868	1.77980031	pglyrp6	35,91879	pglyrp6
rnase13				1.77	1.7	1.9	1,79	0.082865	0.612208	1.059119	1.52859667	rnase13	3,458149	rnase13
rnase14				2.2	3	1.8	2,383333333	0.498888	0.816834	1.413124	1.761536596	rnase14	5,039684	rnase14
ec20	-1.2	-4.1	-0.8	4.1	5.5	3.7	4,433333333	0.717122	0.892893	1.707307	3.893897885	ec20	21,6056	ec20
IL-1 β	-2.2	-0.8	0.57	1.4	1.8	1.6	1,6	0.163230	0.647309	1.138865	1.56244413	IL-1 β	3,031433	C3
IL-8				5.1	5.3	5.9	5,433333333	0.339935	0.731618	1.266699	1.66050039	IL-8	43,2112	IL-8
IL-10				7	2.3	1.8	2,033333333	0.20548	0.666515	1.153007	1.587333765	IL-10	4,093496	IL-10
IL-17a				4.7	5.4	3.9	4,666666667	0.613926	0.893961	1.529252	3.845434482	IL-17a	25,39842	IL-17a
IL-17c				4.9	5.1	5.9	5,3	0.432049	0.779855	1.349149	1.716957997	IL-17c	39,39662	IL-17c
IL-17d	-2	-3.3	-0.2	4.1	5.6	3.7	4,466666667	0.817856	1.018951	1.762785	2.026444539	IL-17d	22,11061	IL-17d
lyc				3.5	4.1	3.8	3,8	0.244849	0.685	1.185051	1.607702533	lyc	13,92881	lyc
mmp9				4.4	5.2	4	4,333333333	0.490808	0.816834	1.413124	1.761536596	mmp9	23,15621	mmp9
dkf1				5.8	6.3	5.2	5,766666667	0.449691	0.78945	1.365748	1.728415007	dkf1	54,4427	dkf1
dkf3				4.6	4.5	4.2	4,433333333	0.169967	0.650308	1.125033	1.569503331	dkf3	21,6056	dkf3



Figur 4:

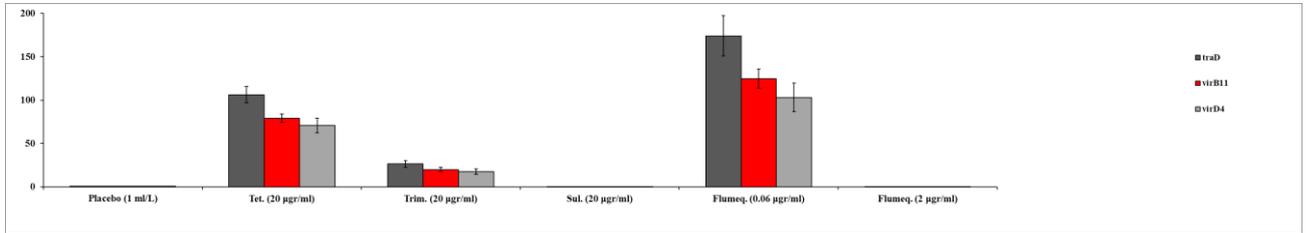


Over er figur 4 i Paper II. **Nedenfor** er to tabeller (den ene tabellen er delt i to pga. lengde) og et diagram fra Excel ark som viser bearbeidelse av dataene. Her er også Ct-verdiene som danner utgangspunktet for analysene med. Jeg har satt en grønn boks inn i tabellen som viser tallene brukt i figuren. I tabellen er det ene settet med STDEV-verdier feil, men det andre er nok riktig og jeg tror det er det han har brukt i figuren (lave verdier og signifikante forskjeller slik vist i figuren).

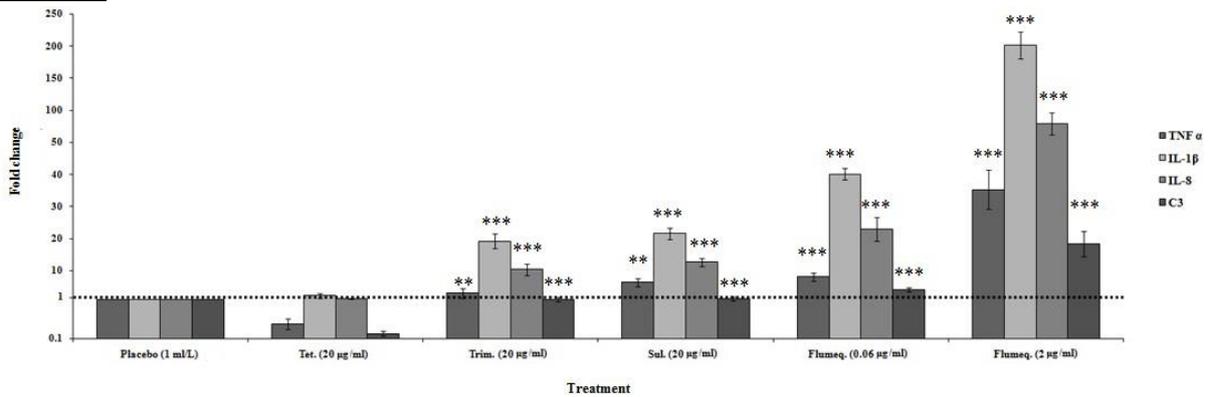
Aud Kari og jeg fant også stokkløsninger med traD, virB11 og virD4 primere der sekvenser matcher de i paperen.

Placebo (1 ml/2xh20)	Fish1	Fish2	Fish3	Fish4	Fish5	Fish6	1	2	3	4	5	6
	18.67	18.56	18.56	18.59	18.42	17.99	19.960384	19.960384	15.032639	11.579433	20.397904	29.319866
	18.899	18.66	18.56	18.59	18	18.9	13.2691273	13.95748146	13.95748146	16.6344443	22.16175449	11.87618857
	17.99	17.28	17.28	18.9	18.46	18	20.5880248	20.5880248	29.6587798	11.87618857	16.112088	21.16175449
	22.47	22.47	22.47	22.47	22.47	22.47						
Tet. (20 µg/ml)	Fish1	Fish2	Fish3	Fish4	Fish5	Fish6	1	2	3	4	5	6
	12	11.8	11.89	12.3	10.99	11.789	1418.382095	1629.239719	1628.217514	1150.058888	2864.48209	1641.728975
	12.3	12.8	12.2	12.199	12.09	12.456	814.6291594	814.6291594	12.91.747216	12.91.60374	13.92.57426	1033.985219
	11.96	11.98	12	13	11.8	11.5	1438.2274	1438.2274	1418.382095	793.176077	1653.289719	2005.882769
	22.47	22.47	22.47	22.47	22.47	22.47						
Trm. (20 µg/ml)	Fish1	Fish2	Fish3	Fish4	Fish5	Fish6	1	2	3	4	5	6
	14	13.56	13.1	13.78	14.1	14.15	354.5800238	481.056476	448.0221293	413.000807	330.842246	319.5726005
	14.3	14.4	15	13.9	14.3	14.3	288.6149721	268.727471	177.530119	380.038041	288.6149721	288.6149721
	14.1	14.3	14.2	13.99	13.89	14.2	303.4423246	248.0248721	303.688039	357.054796	382.6814077	308.688039
	22.47	22.47	22.47	22.47	22.47	22.47						
Sul. (20 µg/ml)	Fish1	Fish2	Fish3	Fish4	Fish5	Fish6	1	2	3	4	5	6
	20	19.8	19.1	19.6	18.9	19.3	5.54637872	6.36429187	10.33482265	7.31054602	11.87618857	9.000467878
	20	19.7	21	21.1	20.2	20.6	6.821079134	6.821079134	2.77018936	2.984705641	4.82221311	3.65532801
	21	21.1	20.9	21.2	20.89	20.91	2.70218916	2.984705641	2.96907141	2.411616555	2.98868497	2.948538435
	22.47	22.47	22.47	22.47	22.47	22.47						
Flumeq. (0.06 µg/ml)	Fish1	Fish2	Fish3	Fish4	Fish5	Fish6	1	2	3	4	5	6
	11	10.89	11.1	11.2	11.3	11.4	2816.704191	393.431261	2646.72857	2469.49431	2384.18777	2149.819768
	12	11.6	11.6	11.7	11.6	11.7	1418.382095	1871.2681	1871.2681	1746.196238	1871.2681	1746.196238
	11	11.6	12.6	11.8	11.7	10.9	2816.704191	1871.2681	9.95.763405	1629.259719	1746.196238	3040.304773
	22.47	22.47	22.47	22.47	22.47	22.47						
Flumeq. (2 µg/ml)	Fish1	Fish2	Fish3	Fish4	Fish5	Fish6	1	2	3	4	5	6
	26.7	26.6	25.29	24.88	25.6	26.68	0.46516496	0.5	1.239707	1.67182636	0.46516496	0.47328823
	26	26.6	26.3	26.4	26.7	27.6	0.75986833	0.5	0.61572707	0.574948177	0.61572707	0.574948177
	26.6	26.3	26.5	26.2	27.9	27.6	0.5	0.61572707	0.515869731	0.65979355	0.20060399	0.25
	25.6	25.6	25.6	25.6	25.6	25.6						

	Placebo (1 ml/L)	Tet. (20 µgr/ml)	Trim. (20 µgr/ml)	Sul. (20 µgr/ml)	Flumeq. (0.06 µgr/ml)	Flumeq. (2 µgr/ml)
traD	1	106,3341016	26,53907509	0,535314742	174,1299906	0,062020071
virB11	1	79,24244761	20,04107156	0,315377456	124,880983	0,041991798
virD4	1	70,9082206	17,51476811	0,142512067	103,0734904	0,024381968

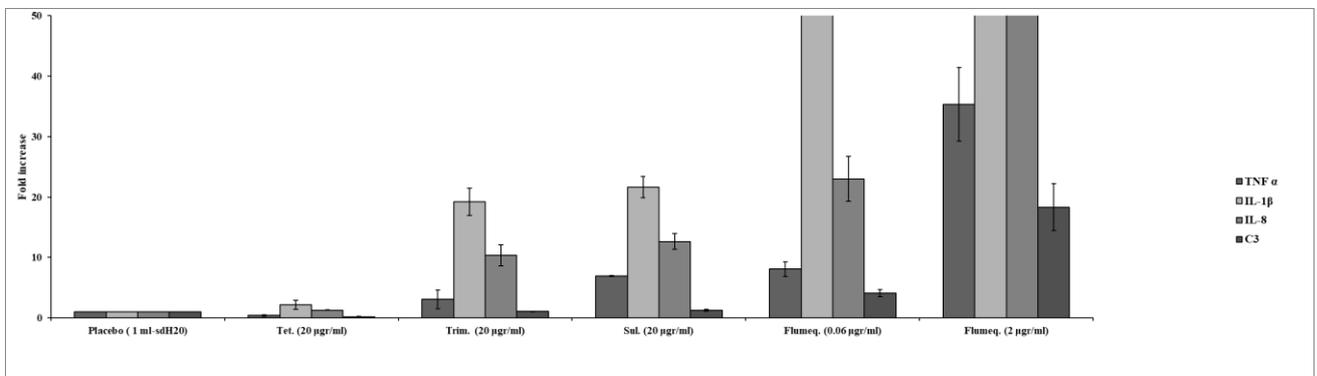


Figur 5:



Over er figur 5 i Paper II. **Nedenfor** er tabell og et diagram fra Excel ark som viser bearbeidelse av dataene. Ct-verdiene som danner utgangspunktet for analysene, og SEM-verdier, ser også ut til å være i Excel arket, men litt vanskelig å tyde hva som er hva. Men det gjennomført normalisering etc.

	Placebo (1 ml-sdH2O)	Tet. (20 µgr/ml)	Trim. (20 µgr/ml)	Sul. (20 µgr/ml)	Flumeq. (0.06 µgr/ml)	Flumeq. (2 µgr/ml)
TNF α	1	0,433	3,07	6,933	8,11	35,33
IL-1β	1	2,2	19,25	21,66	60,22	201,5
IL-8	1	1,31	10,366	12,66	23	79,16
C3	1	0,216	1,09	1,25	4,1	18,33



Fant ellers også real-time qPCR data med notater knyttet opp til Paper II. Her har han skrevet for hånd hva som er target, men finner ikke akkurat disse Ct'ene blant verdiene i Excel arkene jeg har.

Data under fra tekstfil (eksport fra kjøringen) som ser ut til å samsvare med Ct-verdiene over.

Well	Assay	Well Type	Threshold (dR)	Ct (dR)
A1	ROX	Unknown	Reference	Reference
A1	SYBR	Unknown	27.655	No Ct
A2	ROX	Unknown	Reference	Reference
A2	SYBR	Unknown	27.655	No Ct
A3	ROX	Unknown	Reference	Reference
A3	SYBR	Unknown	27.655	No Ct
A4	ROX	Unknown	Reference	Reference
A4	SYBR	Unknown	27.655	No Ct
A5	ROX	Unknown	Reference	Reference
A5	SYBR	Unknown	27.655	No Ct
A6	ROX	Unknown	Reference	Reference
A6	SYBR	Unknown	27.655	No Ct
A7	ROX	Unknown	Reference	Reference
A7	SYBR	Unknown	27.655	10.92
A8	ROX	Unknown	Reference	Reference
A8	SYBR	Unknown	27.655	10.49
A9	ROX	Unknown	Reference	Reference
A9	SYBR	Unknown	27.655	No Ct
A10	ROX	Unknown	Reference	Reference
A10	SYBR	Unknown	27.655	No Ct
A11	ROX	Unknown	Reference	Reference
A11	SYBR	Unknown	27.655	No Ct
A12	ROX	Unknown	Reference	Reference
A12	SYBR	Unknown	27.655	No Ct
B1	ROX	Unknown	Reference	Reference
B1	SYBR	Unknown	27.655	No Ct
B2	ROX	Unknown	Reference	Reference
B2	SYBR	Unknown	27.655	No Ct
B3	ROX	Unknown	Reference	Reference
B3	SYBR	Unknown	27.655	No Ct
B4	ROX	Unknown	Reference	Reference
B4	SYBR	Unknown	27.655	No Ct
B5	ROX	Unknown	Reference	Reference
B5	SYBR	Unknown	27.655	No Ct
C1	ROX	Unknown	Reference	Reference
C1	SYBR	Unknown	27.655	No Ct
C2	ROX	Unknown	Reference	Reference
C2	SYBR	Unknown	27.655	No Ct
C3	ROX	Unknown	Reference	Reference
C3	SYBR	Unknown	27.655	No Ct

C4	ROX	Unknown	Reference	Reference
C4	SYBR	Unknown	27.655	No Ct
C5	ROX	Unknown	Reference	Reference
C5	SYBR	Unknown	27.655	22.12
C6	ROX	Unknown	Reference	Reference
C6	SYBR	Unknown	27.655	24.06
C7	ROX	Unknown	Reference	Reference
C7	SYBR	Unknown	27.655	No Ct
C8	ROX	Unknown	Reference	Reference
C8	SYBR	Unknown	27.655	No Ct
C9	ROX	Unknown	Reference	Reference
C9	SYBR	Unknown	27.655	12.23
C10	ROX	Unknown	Reference	Reference
C10	SYBR	Unknown	27.655	No Ct
C11	ROX	Unknown	Reference	Reference
C11	SYBR	Unknown	27.655	No Ct
C12	ROX	Unknown	Reference	Reference
C12	SYBR	Unknown	27.655	12.00
D1	ROX	Unknown	Reference	Reference
D1	SYBR	Unknown	27.655	No Ct
D2	ROX	Unknown	Reference	Reference
D2	SYBR	Unknown	27.655	No Ct
D3	ROX	Unknown	Reference	Reference
D3	SYBR	Unknown	27.655	No Ct
D4	ROX	Unknown	Reference	Reference
D4	SYBR	Unknown	27.655	No Ct
D5	ROX	Unknown	Reference	Reference
D5	SYBR	Unknown	27.655	No Ct
D6	ROX	Unknown	Reference	Reference
D6	SYBR	Unknown	27.655	No Ct
D7	ROX	Unknown	Reference	Reference
D7	SYBR	Unknown	27.655	11.06
D8	ROX	Unknown	Reference	Reference
D8	SYBR	Unknown	27.655	17.44
D9	ROX	Unknown	Reference	Reference
D9	SYBR	Unknown	27.655	No Ct
D10	ROX	Unknown	Reference	Reference
D10	SYBR	Unknown	27.655	14.18
D11	ROX	Unknown	Reference	Reference
D11	SYBR	Unknown	27.655	17.35
D12	ROX	Unknown	Reference	Reference
D12	SYBR	Unknown	27.655	24.96
E1	ROX	Unknown	Reference	Reference
E1	SYBR	Unknown	27.655	20.54
E2	ROX	Unknown	Reference	Reference
E2	SYBR	Unknown	27.655	24.49
E3	ROX	Unknown	Reference	Reference
E3	SYBR	Unknown	27.655	33.73
E4	ROX	Unknown	Reference	Reference
E4	SYBR	Unknown	27.655	No Ct
E5	ROX	Unknown	Reference	Reference
E5	SYBR	Unknown	27.655	No Ct
E6	ROX	Unknown	Reference	Reference
E6	SYBR	Unknown	27.655	No Ct
E7	ROX	Unknown	Reference	Reference
E7	SYBR	Unknown	27.655	17.89
E8	ROX	Unknown	Reference	Reference
E8	SYBR	Unknown	27.655	21.12
E9	ROX	Unknown	Reference	Reference
E9	SYBR	Unknown	27.655	36.24
E10	ROX	Unknown	Reference	Reference
E10	SYBR	Unknown	27.655	No Ct
E11	ROX	Unknown	Reference	Reference
E11	SYBR	Unknown	27.655	23.69
E12	ROX	Unknown	Reference	Reference
E12	SYBR	Unknown	27.655	No Ct
F1	ROX	Unknown	Reference	Reference
F1	SYBR	Unknown	27.655	No Ct
F2	ROX	Unknown	Reference	Reference
F2	SYBR	Unknown	27.655	No Ct
F3	ROX	Unknown	Reference	Reference