

# Rapport

1-2004

VESO Trondheim Wild and farmed fish health Management

## Evaluering av badebehandlingsmetodikk mot lus i oppdrettsanlegg



# VESO Trondheim

Wild and farmed fish health management

Title: Evaluering av badebehandlingsmetodikk mot lus i oppdrettsanlegg	
Authors: Bjørn Bjøru <sup>(1)</sup> , Arnfinn Aunsmo <sup>(1)</sup> , Vidar Moen <sup>(1)</sup> , Turhan Markussen <sup>(2)</sup>	
Issued by: VESO Trondheim	Sponsor: Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond (FHF)
Project number: 1602	Sponsor's reference: FHF:553033
Project manager: Bjørn Bjøru	Contact person: Bjørn Bjøru, Arnfinn Aunsmo

Date: 23.02.04	Availability: ISBN 82-91743-14-02
Number of pages: 21	Number of attachments: 3
Keywords: sealice, bath treatment, resistance,	
<sup>(1)</sup> : VESO Trondheim, Tungasletta 2, 7485 Trondheim, Tlf. 73 58 07 27, Fax 73 58 07 88 <sup>(2)</sup> Norges veterinærhøgskoleinst. Institutt for biokjemi pb 8146 dep 0033 Oslo	

## **SAMMENDRAG**

I dag brukes bare syntetiske pyretroider til badebehandling mot lakselus. Syntetiske pyretroider er vanskelig å måle direkte. Dosering beregnes på grunnlag av estimater av behandlingsvolum. Det forutsettes at dosen ikke fortynnes til ikke-terapeutisk nivå i løpet av behandlingen. For å unngå fortynning av legemiddel må merden avskjermes ved bruk av hel presenning eller skjørt. For lav dose reduserer effekten av behandlingen og øker risiko for resistensutvikling hos lakselus. For høy dose kan gi toksisk effekt på fisken. Vi har i dag ingen metoder som muliggjør en direkte kontroll med dosering under selve behandlingen. Kvalitetssikring av metode for badebehandling av oppdrettsmerd er derfor ønskelig.

Ved bruk av syntetisk DNA som sporstoff er det utviklet metodikk til kartlegging av konsentrasjonsforskjeller av lusemiddel under avlusning i merd med bruk av skjørt og presenning. Det er gjennomført kvantitative analyser av spredning av bademiddel under avlusning. Analysene baserte seg på samtidig uttak av vannprøver fra fem prøvepunkt pr sjikt og på flere dybdesjikt og tidspunkt i behandlingsperioden.

Resultatene viste en jevnere og raskere fordeling av lusemiddel ved bruk av presenning sammenlignet med bruk av skjørt. Tap av virkestoff ut av merd og fortynning nedover i merd ble påvist ved bruk av skjørt. Resultatene indikerer at dagens praksis for avlusning kan forbedres.

## **ORGANISERING**

Referansegruppa for prosjektet har bestått av:

Bernt Martinsen	Alpharma AS
Bjørn Hembre	Salmar AS
Sturla Romstad	Statens dyrehelsetilsyn (Mattilsynet)

Prosjektet er finansiert av Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond (prosjektnummer 553033). VESO har stått for prosjektledelse og gjennomføring. Samarbeidspartnere i prosjektet har vært Salmar AS, Marine Harvest, Alpharma, ChemTag og Biosmart. Vi takker oppdragsgivere og samarbeidspartnere for godt samarbeid.

## INNHALDSFORTEGNELSE

1	Innledning .....	3
2	Metodikk.....	5
	2.1 Bruk av sporstoff og bademiddel .....	5
	2.2 Uttak av vannprøver .....	6
	2.3 Lokale miljøforhold.....	6
	2.4 Data analyse .....	6
3	Praktisk gjennomføring .....	8
	3.1 Lokalteter og metodikk .....	8
	3.2 Kommentar til gjennomføring.....	9
4	Resultat .....	10
	4.1 Målenøyaktighet.....	10
	4.2 Konsentrasjon og fordeling av bademiddel.....	11
5	Diskusjon .....	15
	5.1 Hvor egnet var anvendt metodikk .....	15
	5.2 Lusetall .....	15
	5.3 Beregnet dose og resistens .....	16
6	Konklusjon.....	16
7	Oppsummering .....	17
8	Forslag til forbedring .....	17
9	Referanser .....	18

## 1 Innledning

Lakselus utgjør i dag en helsemessig og økonomisk utfordring for norsk oppdrettsnæring. Luseangrep påfører fisken hudskader som kan gi osmoregulatoriske problemer og sekundærinfeksjoner. Lakselus representerer også en alvorlig trussel mot ville bestander av laksefisk. Bruk av legemidler til bekjempelse av lakselus er utbredt. Riktig bruk reduserer faren for at lakselus utvikler resistens mot legemidlene. Dersom lusenivå i enkeltmerder overskrider grenseverdier i forskrift om bekjempelse av lakselus skal behandling gjennomføres (Norsk forskrift 2000-02-01 nr 70).

I 2002 var de samlede kostnadene grunnet lus estimert til 100-500 MNK (Havforsknings tema 1-2003). På grunnlag av legemiddelstatistikk (Grave m fl. 2003) og veiledende priser er det beregnet at norsk oppdrettsnæring brukte 58 millioner kroner på legemidler til badebehandling. I tillegg kommer andre kostnader knyttet til behandling, nedsatt vekst og kvalitet på fisken, samt økte driftskostnader.

Det er i hovedsak tre måter å avluse et oppdrettsanlegg på:

- ved bruk av leppefisk
- ved bruk av orale lusemidler (fôrtilskudd)
- ved bruk av badebehandling.

For avlusing av stor fisk i sjø er badebehandling mest brukt.

### Badebehandling og anbefalt bruk

Badebehandling foregår ved at et legemiddel blandes inn i vannmassene fisken oppholder seg i. For å unngå ukontrollert fortykning av legemiddelet brukes det ulike typer avskjerming av merden under behandlingen. Opprinnelig ble hel presenning brukt til avskjerming. Denne metoden gir fullstendig skille mellom behandlet vannvolum og ytre miljø. Etter hvert som driftsenhetene er blitt større og legemidlene mer effektive har det blitt vanlig å benytte skjørt istedenfor presenning. Skjørtet er en duk som dras rundt og dekker sidene av merden. Skjørtet blir hengende langs notveggen, men forblir åpen i bunnen. Det er enklere å sette et skjørt enn en hel presenning og det anses som tryggere for fisken fordi det kan fjernes raskt hvis komplikasjoner skulle oppstå. Risiko i forbindelse med en behandling knyttes oftest til fall i oksygenivå, overdosering av stoff eller klemming av fisk grunnet strøm.

Statens Legemiddelverk utformet i 1999 terapianbefalinger for behandling mot lakselus i oppdrettsanlegg (SLK 2000). Det fremheves at badebehandling fortrinnsvis bør utføres i lukkede enheter som brønnbåter eller ved bruk av hel presenning rundt merd.

I 2001 og 2002 ble det kun brukt syntetiske pyretroider til badebehandling (Grave m fl. 2003). Det finnes i dag to godkjente legemidler med pyretroider som aktivt stoff til badebehandling av laksefisk mot lus. Disse er Alphamax® og Betamax® med henholdsvis deltametrin og cypermetrin som virkestoff. Disse virkestoffene er svært viktige i bekjempelsen av lakselus i norsk oppdrettsnæring.

Produsentene har gitt behandlingsanbefalinger både for bruk av hel presenning og skjørt. Doseringen for bruk av Alphamax® og Betamax® er henholdsvis 2 og 15 ppb virkestoff ved bruk av presenning og 3 og 20 ppb virkestoff ved bruk av skjørt. Behandlingstid for presenning og skjørt er henholdsvis 30 og 40 minutt for begge legemidlene. Konsentrasjon beregnes ut fra det volum som er avskjermet ned 4 meter, uavhengig av om det står fisk på

større dyp. Dersom merden er grunnere enn 4 meter under behandling brukes aktuell dybde. Overdosering i et merdanlegg kan føre til økt dødelighet hos fisk grunnet toksiske konsentrasjoner.

Resistensutvikling kan skje ved ensidig bruk av en type legemiddel. Det er tidligere dokumentert redusert følsomhet for organofosfater hos lakselus som et resultat av omfattende bruk (Jones m fl. 1992; Midttun m fl. 2000). Størst risiko forekommer når lakselusa eksponeres for subletale (ikke dødelige) doser av lusingsmidler (Devine m fl. 2000, Midttun m fl. 2000). I Norge er det registrert forskjeller i følsomhet for deltametrin mellom ulike populasjoner lakselus (Sevatdal og Horsberg 2003). Variasjon i følsomhet kan gi grunnlag for utvikling av resistens ved behandling med subletale doser.

Effekten av en behandling forventes å variere med konsentrasjon av bademidlet og behandlingstiden. Bademidlets evne til å fordele seg i behandlingsvolumet vil påvirke konsentrasjonen i ulike deler av merden. Det ønskelige er en rask og jevn fordeling av bademiddel i tid og rom. Kvalitetssikring av badebehandlingene vil trolig være et viktig tiltak for å redusere risikoen for utvikling av resistens mot pyretroider.

### **Mål med prosjektet**

Målet med prosjektet har vært å evaluere og sammenligne effekten av ulike avskjermingsmetoder ved badebehandling mot lus i merd. Delmål har vært:

- Utvikle metodikk for kontroll med dosering av løst stoff i oppdrettsmerd.  
Få et kvantitativt mål på kjemikalier (lusemidlet) som ikke lar seg måle direkte ved bruk av sporstoff.
- Dokumentere innblanding og distribusjon av bademiddel ved bruk av skjørt og presenning  
Beskrive forventet dose under behandlingsperioden og beregne spredning og fortykning av bademiddel i hele behandlingsområdet.
- Utvikle forsøksoppsett for sammenligning av ulike avlusingsmetoder ved badebehandling.  
Utvikle et forsøksoppsett som gir en god beskrivelse av fordelingen av sporstoff over tid i merd ved ulike behandlingsopplegg.

## 2 Metodikk

### 2.1 Bruk av sporstoff og bademiddel

I dette prosjektet er det anvendt Alphamax® med virkestoffet deltametrin til avlusing av fisk. Alphamax® tilsettes i konsentrasjon som tilsvarer 2ppb deltametrin ved jevn fordeling ned til fire meters dyp ved bruk av presenning, og 3ppb deltametrin ved bruk av skjørt. Ved så lave konsentrasjoner kan virkestoffet ikke måles direkte. For å beregne konsentrasjon av legemiddelet ble det tilsatt et sporstoff som lar seg detektere og kvantifisere.

Mengden bademiddel anvendt er beregnet ut fra et volum ned til 4 m dyp etter gjeldende produktanbefalinger:

- Presenning: 0,2ml pr m<sup>3</sup>, for 24x24 merd, totalt 460,8 ml Alphamax®.
- Skjørt: 0,3ml pr m<sup>3</sup>, for 24x24 merd, totalt 691,2 ml Alphamax®.

Sporstoff og bademiddel ble blandet rett før avlusing. Det ble deretter tatt en kontrollprøve. Blandingen ble fordelt i en stamp med ca 50 liter vann. Bademiddelet ble tilsatt med bruk av bøtter fra hver side av merden.

### Valg av sporstoff

Syntetisk framstilte DNA-molekyler ble brukt som sporstoff. DNA-molekylene gis en unik kode som vil fungere som molekulære merkelapper i behandlingsvolumet. Metoden har et stort anvendelses område, blant annet ved studier av fortykning og spredning av vann i bevegelse (Sabir et al. 1999 og 2000). Syntetiske DNA-molekyler inneholder ikke genetisk informasjon og påvirker ikke levende organismer eller miljøet for øvrig. Syntetisk framstilt umodifisert DNA er godkjent av Næringsmiddeltilsynet for tilsetning i drikkevann. Deteksjonsgrensen er svært lav og molekulære konsentrasjoner er tilstrekkelig for sikker identifisering av sporstoffet. Sporstoffet er enkelt å håndtere og kan tilsettes uten spesiell kompetanse. Bruk av en unik DNA-sekvens for hvert forsøk hindret forurensing mellom hver gjennomføring.

Før oppstart av prosjektet ble det undersøkt om bademiddelet innvirket på DNA-sporstoffet eller analysemetoden og om sporstoffet sprer seg homogent i nærvær av bademiddelet. Det ble ikke registrert noen problemer i denne forbindelse. Det ble også gjennomført tester for å undersøke om utstyr som rør og slanger hadde noen påvirkning på sporstoffet ved prøvetakningen som tap av sporstoff grunnet adsorpsjon til plasten eller lignende. Slike effekter ble ikke registrert.

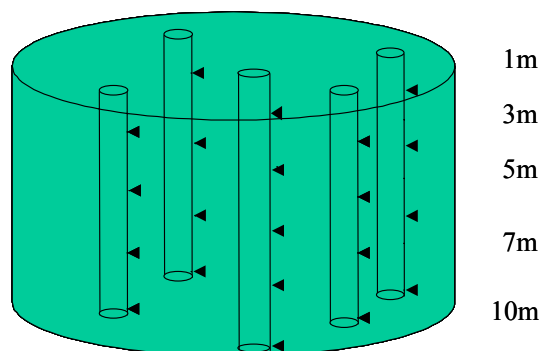
### Forutsetninger

Pyretroider, som er virkestoffene i bademiddel, er hydrofobe og spres ikke lett i vann. Bademiddelet er tilsatt dispergeringsmiddel for at virkestoffene skal spre seg best mulig. Løsningen spres raskt ved at bademiddelet deles i svært små dråper med pyretroider inni (mikroemulsjon). Dråpene løses ut når de treffer en fettløselig overflate (fiskehud). Syntetisk DNA er hydrofilt og sprer seg hurtig i vann. Det forutsettes at sporstoff og virkestoff fordeles tilnærmet likt under behandlingen. Forskjeller i spredningsegenskaper hos sporstoff og bademiddel kan påvirke resultatene. Imidlertid vil spredningen av sporstoff skje på samme måte ved alle gjennomføringer slik at forskjeller i spredning som skyldes ulik avskjerming forventes å kunne påvises.

## 2.2 Uttak av vannprøver

En vannprøvehenter ble utviklet for effektiv og nøyaktig innsamling av vannprøver. En peristaltpumpe ble koblet til hver av de fem prøvesøylene (fig. 1) med en egen slange fra hvert innsamlingsdyp. Alle slangene var like lange slik at transporttiden av vannet opp i prøveglasset er likt for alle punkt. Variasjon i transporttid for vatnet ble målt til under en prosent. Pumpehastigheten ble kontrollert og synkronisert før innsamling av prøver startet.

Vannprøver ble samlet inn ved 1, 3, 5, 7 og 10 meters dyp i fem søyler (fig. 1). Det ble samlet inn 21 vannprøver hvert 5. minutt fra tidspunkt for tilsetning av lakselusmiddel. Prøvene tatt etter 5, 10, 20 og 30 minutt ble analysert. Ved piloten ble det tatt prøver på 1, 2, 3 og 4 meters dyp.



**Figur 1.** Innsamlingspunkter for vannprøvene tatt under avlusing i mars og juni 2003. Det ble tatt prøver i 5 søyler på 1, 3, 5, og 7m dyp. I midten ble det også tatt prøver på 10 m dyp.

## 2.3 Lokale miljøforhold

Bruk av ulike lokaliteter ved forsøk vil medføre miljøforskjeller, se tabell 3. Fiskestørrelse og tetthet antas å betyding på fordeling av bademiddel i ei merd og ble derfor forsøkt holdt mest mulig likt mellom forsøkene.

Følgende parametre ble samlet inn:

- a) Strømmålinger på lokaliteten ved behandling med skjørt
- b) Oksygenivå i merden under behandling
- c) Salinitet
- d) Temperatur
- e) Mengde lus på fisken før og etter behandling

I tillegg ble fiskens plassering og adferd under behandling observert med undervannskamera.

## 2.4 Data-analyse

### Analyseresultat av vannprøvene

Kvantitative målinger av sporstoff baserer seg på PCR-analyse. En streng av et DNA-sporstoff oppformerer før telling. Resultater gjengis som Ct-verdier, som omregnes til antall DNA-molekyler i prøven før PCR-reaksjonen. Antall DNA-molekyler angir ikke en absolutt verdi men er en relativ verdi i forhold til konsentrasjon i en stamløsning. Mer detaljerte opplysninger er gitt i vedlegg 1.



### Omregning fra DNA-molekyler til ppb pyretroider

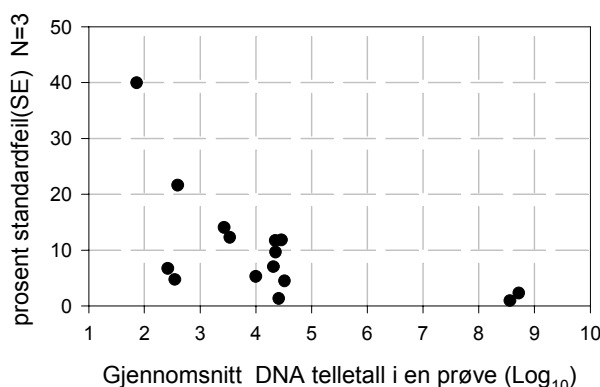
Antall DNA-molekyler i vannprøvene ble funnet ved PCR-analyse. Konsentrasjon av pyretroider beregnes ut fra hvor mye sporstoffet er fortynnet i innsamlede prøver i forhold til konsentrasjonen i en stamløsning. Det ble analysert tre delprøver fra hver prøve, disse var på 4µl og ble analysert separat. Gjennomsnittet av de tre prøvene ble brukt som mengde DNA i 4µl av en bestemt prøve.

Siden PCR-metoden er en enzymatisk deteksjonsmetode vil denne være sensitiv overfor forskjellige typer inhibitorer i sjøvann. Forut for analyse av vannprøvene ble det gjennomført fortynningstester av sjøvannet for å fortynne potensielt hemmende stoffer på PCR-analysen. Disse testene ble gjennomført forut for analyse av feltprøver fra alle feltforsøkene. På bakgrunn av disse analysene ble en fortynning på 10 valgt for prøvene fra pilotforsøket og en fortynning på 4 på prøvene fra forsøk 1 og 2. Prøvene fra forsøk 3 ble ikke fortynnet før analyse.

### Metodens sikkerhet

Variasjon i antall DNA-molekyl ved tre uavhengige analyser fra hver vannprøve viser analysemetodens usikkerhet og kan uttrykkes som standardfeil ( $SE=SD/(n)^{1/2}$ ). Høy standardfeil kan skyldes klumping av sporstoff eller unøyaktighet i analysen av sporstoffet. Forholdet mellom konsentrasjon sporstoff og standardfeil ble estimert ut fra tidligere analyser av Chemtag (se fig. 2). Spredningen og målefeilen ved DNA – tellemetoden reduseres ved økende konsentrasjon av sporstoff i prøven, og konsentrasjonen bør være så stor at standardfeilen (SE) er minst mulig. Standardfeil, i prosent av gjennomsnittet, synes å komme under 10 % ved en konsentrasjon på mellom ti og femti tusen DNA-molekyl pr prøve.

Ved pilotundersøkelsen ble det brukt  $10^{17}$  DNA-molekyl som sporstoff. Ved et volum på  $5760m^3$  eller  $5,76 \times 10^{12}\mu l$  vil det ved jevn fordeling sporstoff være  $6,95 \times 10^5$  DNA-molekyl hver vannprøve (4µl). Ved konsentrasjoner av sporstoff på dette nivået forventes standardfeilen å komme på under 10%. Minste aksepterte verdi har vi når konsentrasjonen sporstoff er så liten at SE øker til  $\geq$ gjennomsnittsverdien. Er standardfeilen større en dette må vi anta at konsentrasjonen av virkestoff i bademiddel kan være null eller en nullverdi kan være på størrelse med SE.



**Figur 2.** Variasjon i tellinger av DNA for tre delprøver av 15 ulike enkeltprøver, som hver har en ulik konsentrasjon. Tallene er fra tidligere analyser av antall DNA sekvenser i vannprøver.

Ved analysering av prøver fra piloten var konsentrasjonen av DNA i prøvene så lav at spredningen i avlesingene ble større enn ønsket. Dette kunne delvis skyldes tap av sporstoff ut av merden under avlusing. For å sikre tilfredstillende målenøyaktighet ble konsentrasjonen av sporstoff økt til  $10^{18}$  DNA-molekyl ved bruk av skjørt som avskjerming.

### Kontrollprøver

I hvert forsøk ble bademiddel og sporstoff blandet i et gitt volum vann og det ble tatt en kontrollprøve. Ved gitt mengde sporstoff blandet i en gitt mengde vann kan konsentrasjon av sporstoff ved fullstendig innblanding beregnes (tabell 1). Sporstoffet ble blandet i ulik mengde vann og samtidig varierte mengden sporstoff slik at teoretisk konsentrasjon varierer fra forsøk til forsøk. Teoretisk mengde sporstoff ble sammenlignet med beregnet mengde sporstoff, dette for å se om analysen av sporstoffet fungerte. Analysene av sporstoff anses som vellykte. Analyseresultatene varierte fra teoretisk verdi, dette antas å skyldes ufullstendig innblanding i prøvevolumet.

**Tabell 1.** *Analyseresultat av kontrollprøver, beregnet teoretisk verdi og analysert verdi.*

Forsøk	Teoretisk-verdi	Analysert verdi
Pilot (skjørt)	$7,1 \cdot 10^7$	$1,7 \cdot 10^7$
Forsøk 1 (presenning)	$8,0 \cdot 10^4$	$2,3 \cdot 10^5$
Forsøk 2 (presenning)	$1,1 \cdot 10^4$	$2,4 \cdot 10^4$
Forsøk 3 (skjørt)	$8,0 \cdot 10^4$	$2,8 \cdot 10^4$

*Kontrollprøvene er fortynnet med en faktor på  $10^3$ - $10^7$  før analyse*

### Statistisk behandling

Ved testing av forskjell i konsentrasjon av sporstoff mellom ulike tidsperioder og soner innen en merd, samt mellom forsøk, ble det nyttet ikke parametriske ranktester.

## 3 Praktisk gjennomføring

### 3.1 Lokalteter og metodikk

Prosjektet er gjennomført ved to lokaliteter i Nord Trøndelag som bruker forskjellig metodikk ved avlusing; skjørt og presenning (tabell 2). Forsøkene ble gjennomført som del av ordinær avlusing av anleggene. Lusetellinger viser over 90% reduksjon av lus ved alle forsøk, vedlegg 2. Bakgrunnsdata for de ulike forsøkene er gitt i tabell 3. Ved forsøk 3 var det en strøm på 1,2cm/s i sørvestlig retning ved avlusing.

### Avskjerming

Ved bruk av skjørt ble nota linet opp slik at bunnlina var på 10 m dyp, dødfiskhåven ble ikke hevet. Presenningen som ble brukt var på ca 8m dyp på sidene og ca 10m dyp i midten, se fig.3. Avskjermet volum ble beregnet ut fra en grunnflate på 24x24m og et dyp på 10 m.. Ved bruk av presenning er de 2 nedre meterne av avskjermingen antatt å ha pyramide form. Avskjermet volum ved bruk av skjørt og presenning ble henholdsvis  $5760 \text{ m}^3$  og  $4992 \text{ m}^3$ .

**Tabell 2.** Lokalteter og type anlegg brukt i forsøkene.

	Pilot og forsøk 3	Forsøk 1 og forsøk 2
Navn på lokalitet	Ølenvika	Kjelneset
Eier	Salmar/ VESO*	Marine Harvest
Type anlegg	Stålanlegg	Stålanlegg
Alder (tidspunkt utsett)	Høst 2001	Høst 2001
Merdstørrelse	24x24 meter	24x24 meter
Avlusingsmetodikk	Skjørt	Presenning
Oksygentilsetting	2 rister	3 rister
Opplining	10 m	7-11 meter

\*Forsøk gjennomført ved VESO sin FoU-konsesjon som drives i samdrift med Salmar.

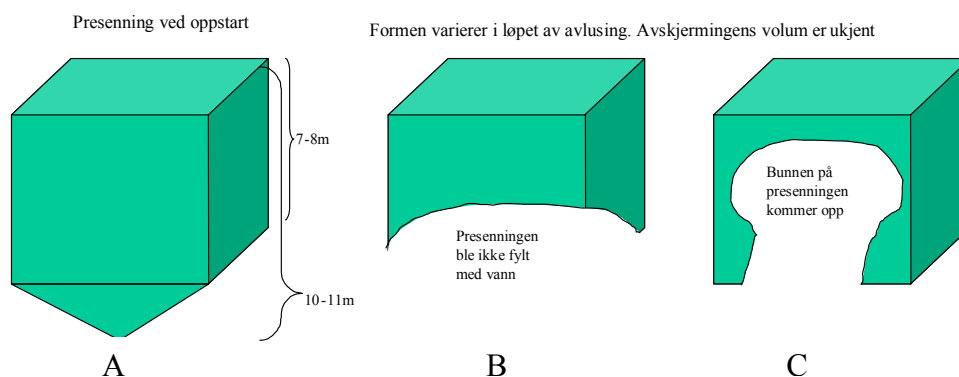
**Tabell 3.** Målte parametere ved gjennomføring av de ulike forsøkene.

Forsøk	Avskjerming	Lokalitet	Dato	Salinitet ‰	Temp °C		Antall fisk	Biomasse kg	Snittvekt kg
					1m	4 m			
Pilot	(skjørt)	Ølenvika	17.11.02	33	6,7	5,0	45785	132 410	2,9
Forsøk 1	(presenning)	Kjelneset	13.03.03	32,5	4,5		66 763	201 311	3,5
Forsøk 2	(presenning)	Kjelneset	17.03.03	32,5	4,5		75 051	217 457	2,9
Forsøk 3	(skjørt)	Ølenvika	11.06.03	20	11	9,3	56 039	222 228	3,9

### 3.2 Kommentar til gjennomføring

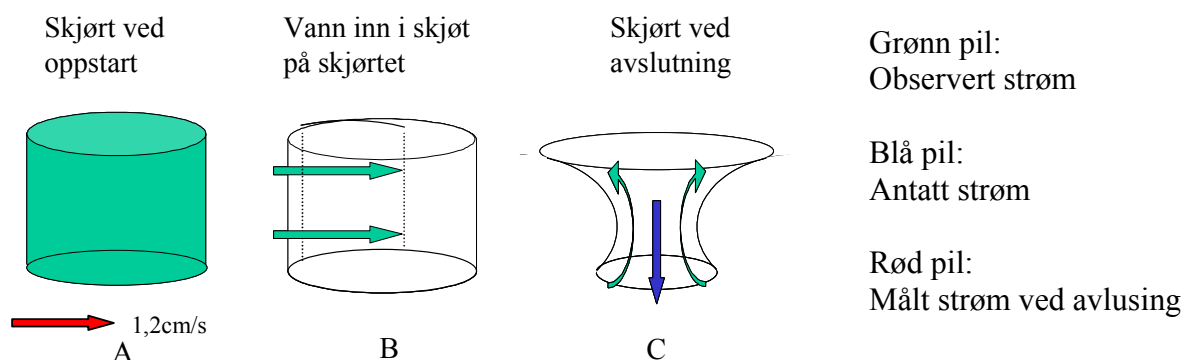
Metodikken brukt ved gjennomføring av prosjektet avviker fra anbefalt metodikk ved avlusning. Gitte anbefalinger tilsier at bunnlina skal heves til 4m og bademiddelet fortynnes kraftig og tilsettes med pumpe (Midtun et al. 2000b). Vi brukte en enklere metodikk fordi denne er vanlig i næringa, og fordi det er lettere å standardisere en enkel metode.

Ved gjennomføring av forsøk 1 med presenning opplevde vi at det ble for lite vann inne i presenningen og ansamling av luft under presenningen. Dette medførte ustabil form og problemer med at bunnen av presenningen tidvis ble presset opp (fig. 3). Behandlingsvolumet ble derfor vesentlig mindre enn planlagt. Dette er et ofte registrert problem (Treasurer 2000).



**Figur 3.** Presenningen sin form og volum ved forsøk 1. Tegning A viser presenningens normale form. Tegning B og C viser hvordan formen til presenningen endret seg under avlusninga.

Det ble observert vannstrøm inne i merden ved alle avlusningene med skjørt som avskjerming (figur 4). Det skjedde også en innsnevring av merdene som indikerer at vann suges ut under avlusning.



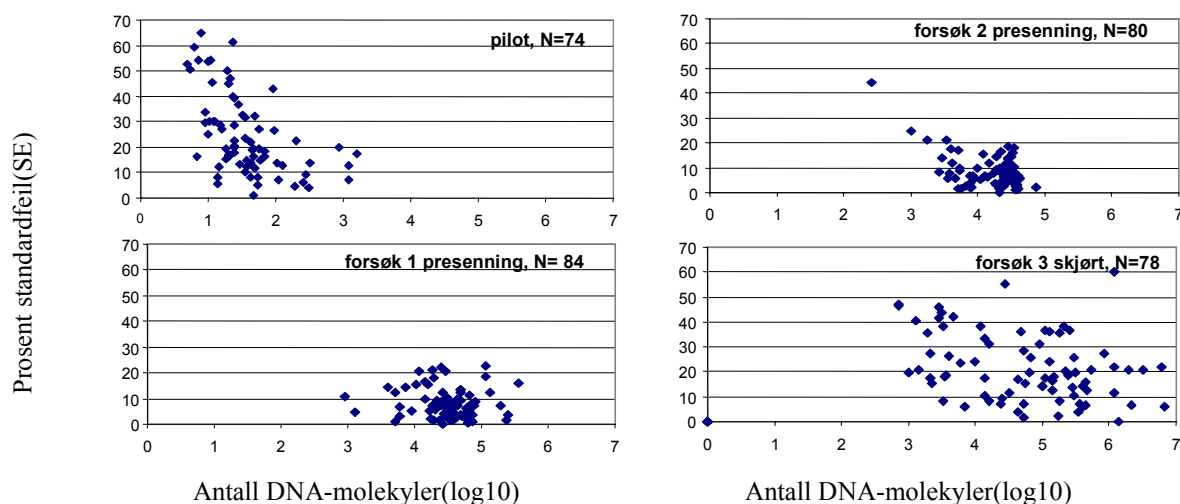
**Figur 4.** Skjørtets form og vannstrøm i og rundt merd ved forsøk 3. Tegning A viser skjørtets form og vannstrømmer under merda ved oppstart av badebehandlingen. tegning B viser observert vannstrøm inn i skjøten på skjørtet. Tegning C viser hvordan vannstrømmer i merda endrer avskjermingens form og volum.

Ved alle forsøk ble det med undervannskamera observert fisk fra overflata og ned til 10m dyp. Fisken var fordelt i hele det tilgjengelige volum.

## 4 Resultat

### 4.1 Målenøyaktighet

Konsentrasjon av sporstoff målt ved bruk av PCR-teknikk viste variasjon mellom tre parallelle delprøver fra hver vannprøve. Variasjonen gav et mål på usikkerheten ved selve analysemetoden. Spredningen er vist i form av standard feil i figur 5, gjennomsnittlig standardfeil og standard avvik er vist tabell 4. Resultatene viser at de relativt lave konsentrasjoner av sporstoff som ble funnet i prøvene fra pilotstudiet gav stor variasjon sammenlignet med de senere forsøkene. Standard feil på over 20% vurderes som lite ønskelig. Dette var imidlertid situasjonen i pilotforsøket og i forsøk 3.



**Figur 5.** Variasjonen i resultatene ved tre uavhengige analyser av en prøve, viser sporstoff analysenes nøyaktighet. Variasjonen er uttrykt som standardfeil i prosent av gjennomsnittets verdien.

**Tabell 4.** Gjennomsnittlig standardfeil ved analysen av sporstoff for pilot, forsøk 1, forsøk 2 og forsøk 3.

Forsøk	Gj.sn. standardfeil	Standardavvik
Pilot (skjørt)	25,3	20,1
Forsøk 1 (presenning)	8,9	11,5
Forsøk 2 (presenning)	10,7	16,9
Forsøk 3 (skjørt)	21,7	13,4

#### 4.2 Konsentrasjon og fordeling av bademiddel

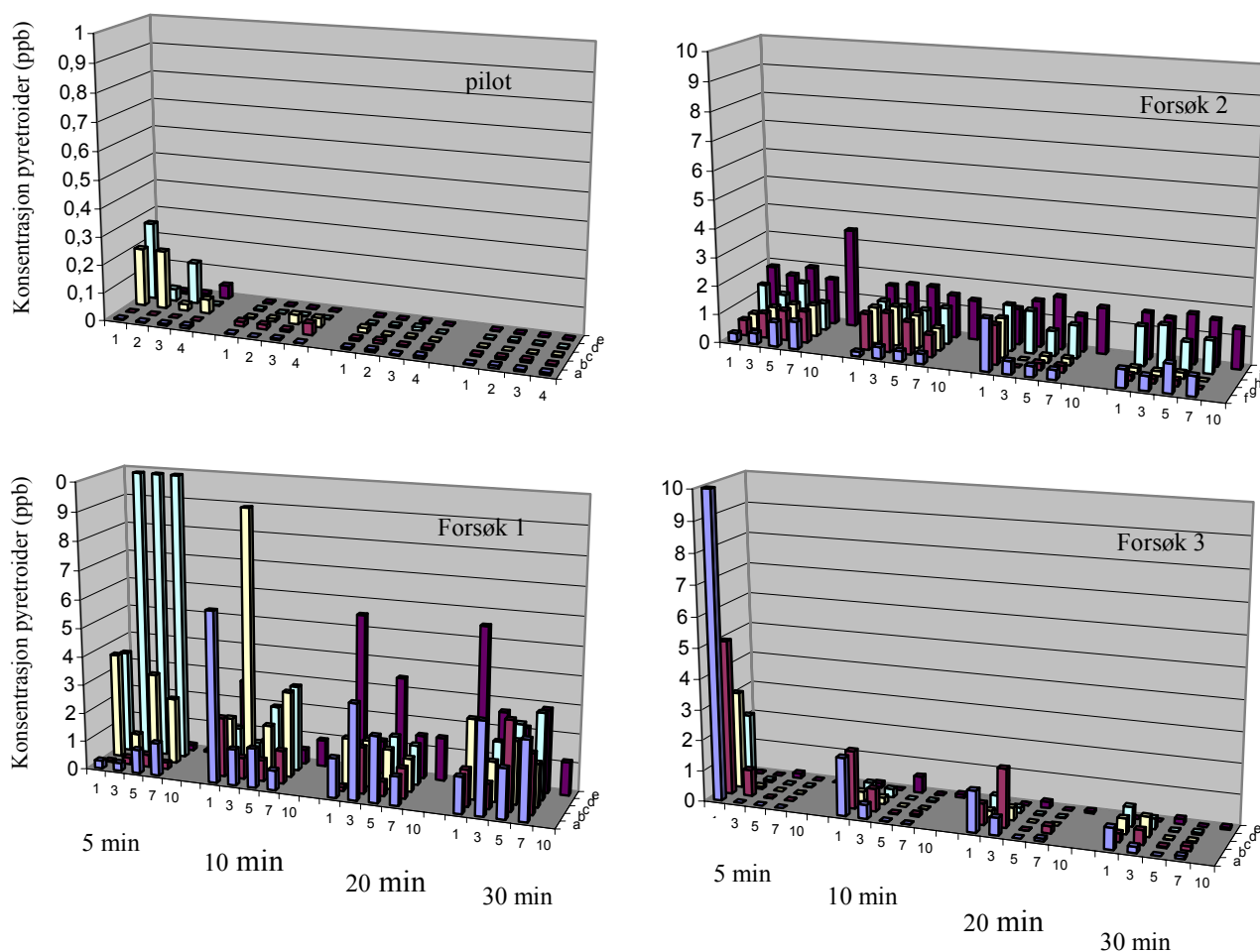
Det doseres for å få en konsentrasjon som tilsvarer 2ppb deltametrin ved jevn fordeling ned til fire meters dyp ved bruk av presenning, og 3ppb deltametrin ved bruk av skjørt. Uavhengig av opplining av nota er volumet som bademiddelet kan spres i større enn det volum det doseres etter. Vi må derfor forvente lavere konsentrasjon enn 2 og 3 ppb for bruk av henholdsvis presenning og skjørt ved avlusing. Likeledes må det forventes et tap ut av merden ved bruk av skjørt, noe som vil medføre en ytterligere reduksjon i konsentrasjon av deltametrin.

Avskjermet volum i merdene med skjørt var antatt å være 5760 m<sup>3</sup>. Dersom bademiddelet sprer seg jevnt i hele volumet oppnåes en teoretisk konsentrasjon av deltametrin på 1,2 ppb. Ved bruk av presenning var avskjermet volum antatt å være 4992 m<sup>3</sup>. En jevn fordeling av sporstoffet i dette volumet gir en konsentrasjon av deltametrin på 0,92ppb. Beregnet gjennomsnittskonsentrasjon og teoretisk konsentrasjon for hvert forsøk er vist i tabell 5. Resultat for alle prøvepunkt er vist i fig. 6.

**Tabell 5.** Gjennomsnittlig konsentrasjon av deltametrin ( $\pm$  standardavvik) beregnet ut fra mengden sporstoff i alle innsamlingspunkt for pilot, forsøk 1, forsøk 2 og forsøk 3. Teoretisk konsentrasjon utledet fra fullstendig fordeling i avskjermet volum.

Forsøk	Beregnet kons. deltametrin (ppb) gj.snitt $\pm$ SD	Teoretisk kons. deltametrin (ppb)
Pilot (skjørt)	0,02 $\pm$ 0,05	1,20
Forsøk 1 (presenning)	2,19 $\pm$ 2,57	0,92
Forsøk 2 (presenning)	0,98 $\pm$ 0,65	0,92
Forsøk 3 (skjørt)	0,53 $\pm$ 1,49	1,20

I pilotundersøkelsen var utledede verdier for konsentrasjon av deltametrin (0,02ppb) systematisk lave, og langt under det som var forventet (1,20 ppb). Beregnede verdier av deltametrin ble ukorrekt lave. Det antas imidlertid at verdiene beskriver relativ fordeling av bademiddel i merda. Årsaken til at verdiene ble så lave er ukjent. Kontrollverdiene var imidlertid som forventet (tabell1). Det viser at det ikke var feil med selve sporstoffet. At de beregnede verdiene var for lave underbygges ved at behandlingen ga over 90% reduksjon av lus på fisken (vedlegg 2).

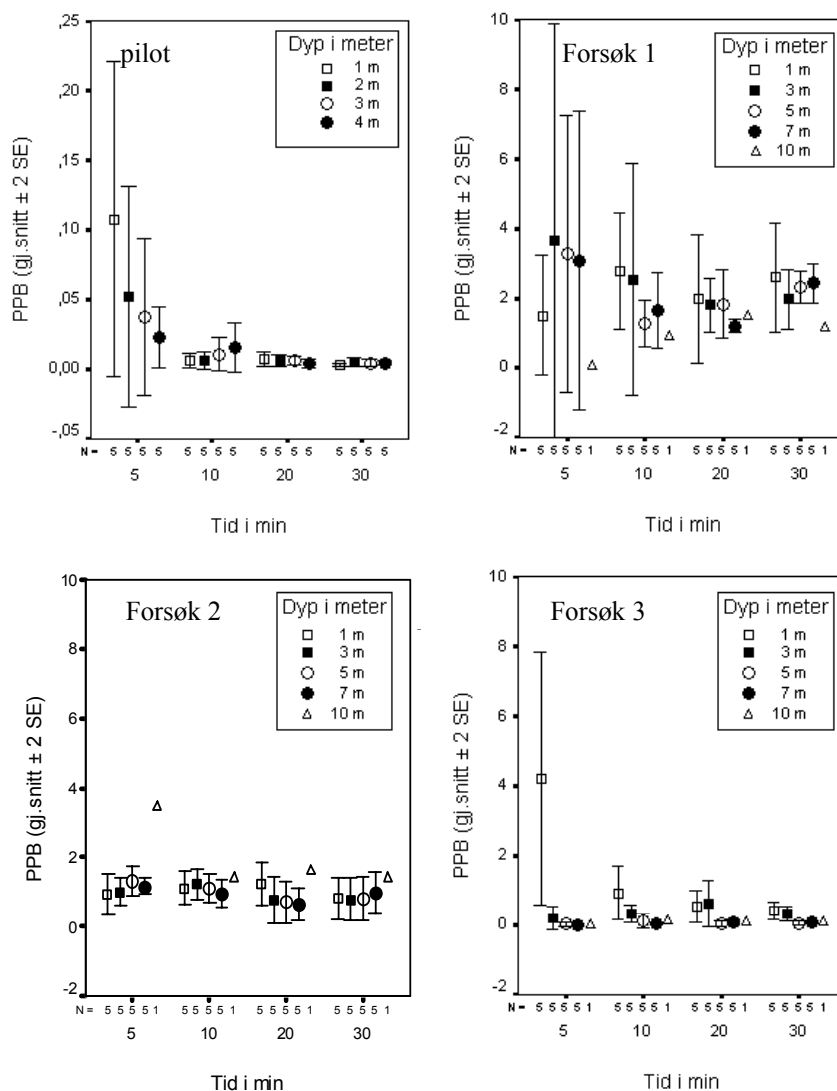


**Figur 6.** Konsentrasjon av pyretroider i ppb utledet av sporstoffmengden i vannprøvene. Verdien i hvert prøvepunkt etter 5, 10, 20 og 30 minutt behandling, "a-e" og "f-j" representerer ulike prøvesøyler. Tallene på x-aksen viser innsamlingsdyp, 1, 3, 5, 7 og 10 meter.

I forsøk 1 ble gjennomsnittlig konsentrasjon deltametrin beregnet til 2,2 ppb, dette var høyere enn forventet (tabell 5). Den høye verdien kan forklares med at avskjermet volum ble vesentlig mindre enn forutsatt, se fig. 3. Det ser ut til at avskjermet volum i dette tilfelle var omtrent det som det ble dosert etter, 4992m<sup>3</sup>.

I forsøk 2 ble gjennomsnittlig konsentrasjon av pyretroider beregnet til 0,98ppb, altså nære forventet verdi på 0,92 ppb. (tabell 5). I forsøk 3 var konsentrasjonen av pyretroider lav med et gjennomsnitt på 0,53, langt under teoretisk verdi på 1,2ppb (tabell 5).

Sporstoffet fordelte seg over hele merden under hele behandlingen for alle forsøk (fig. 6 ). Gjennomsnittskonsentrasjon og spredning av verdier omregnet til ppb deltametrin for hvert innsamlingsdyp og samplingstidspunkt er vist i figur 7 og vedlegg 3. Spredning av verdier er størst tidlig i behandlingen, med unntak av forsøk 2 hvor spredningen er liten i hele behandlingsperioden.



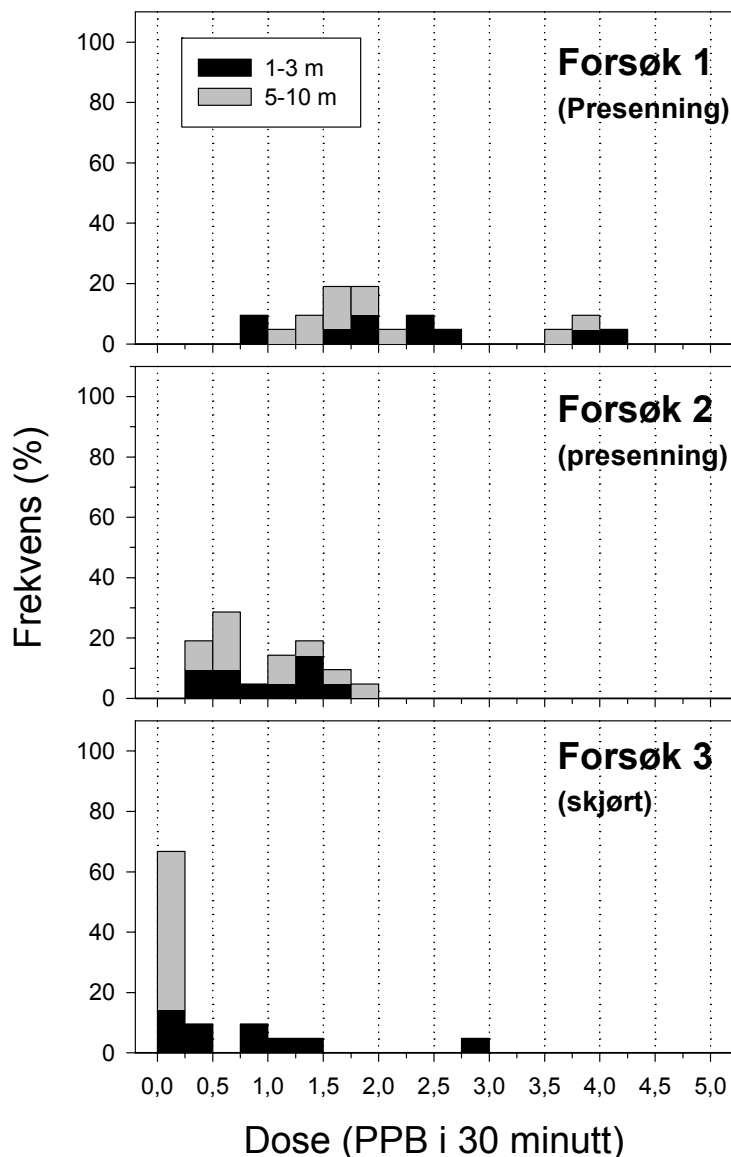
**Figur 7.** Beregnede konsentrasjoner av deltametrin (Gj.snitt ± 2standardfeil) etter 5,10, 20 og 30 minutter ved hvert innsamlingsdyp. N = antall prøver per dyp og tidspunkt.

Relativ endring av beregnet konsentrasjon deltametrin over tid var signifikant forskjellig mellom forsøkene, dette med unntak av mellom piloten og forsøk 3. Begge ble gjennomført med skjørt som avskjerming (tabell 6).

**Tabell 6.** Test for endringer av konsentrasjon over tid. Konsentrasjon av stoff (log 10 ppb) som funksjon av tid medregnet alle dyp mellom to og to forsøk. Lineær regresjon,  $H_0$  forkastes ved lave verdier av t.

Forsøk	t-verdi	Frihetsgrader	Sign.nivå, P
pilot-forsøk1	11,2746	160	0,0005
pilot- forsøk 2	8,4890	160	0,0005
pilot- forsøk 3	0,0055	160	0,5
forsøk 1- forsøk 2	3,9916	164	0,0005
forsøk 1- forsøk 3	7,3090	164	0,0005
forsøk 2- forsøk 3	3,8349	164	0,0005

Forekomst av ulike doser i øvre og nedre del av merda er vist i figur 8. Ved bruk av presenning ble det oppnådd like høye doser høyt oppe og langt nede i merda (forsøk 1 og 2). Ved bruk av skjørt var alle beregnede verdier større enn 0,25 ppb registrert på 1-3m dyp (forsøk 3). Det ble registrert signifikant forskjell i konsentrasjon mellom øvre sjikt (1m) og midtre sjikt (5m) i forsøk 3 (tabell 7).



**Figur 8.** Beregnet dose av bademiddel (ppb deltametrin) i 30 minutt, øverst (1-3m) og nederst i merden (5-10m). Gjennomsnitt for alle verdier i et innsamlingspunkt er veid etter tiden mellom innsamlingene.

**Tabell 7.** Test for forskjeller i konsentrasjon beregnet lusemiddel i øvre sjikt (1m) og midt i merden (4 og 5m). Mann-Whitney Rank Sum Test.

Gruppe	N <sub>1m</sub>	N <sub>5m</sub>	T	P
pilot, 1og 4mdyp (skjørt)	20	20	431	0,579
forsøk 1, 1og 5m dyp (presenning)	19	20	367	0,725
forsøk 2, 1og 5m dyp (presenning)	20	20	440	0,425
forsøk 3, 1og 5m dyp (skjørt)	18	20	470,500	<0,001



## 5 Diskusjon

### 5.1 Hvor egnet var anvendt metodikk

Vurdering av dose i stedet for effekt, som har vært benyttet tidligere, antas å gi bedre måleparametere. Dette gir nye muligheter til forbedring av avlusingsmetoder. Beregning av konsentrasjon pyretroider i merd gir muligheter til å sammenligne resultat fra laboratorieforsøk med resultat fra felt. Kunnskap om fordeling av bademiddel i ulike deler av behandlingsvolumet er viktig for å kunne gjennomføre gode avlusinger.

### Vannprøvehenteren

Vannprøvehenteren fungerte etter hensikten. Posisjonering av det enkelte innsamlingspunkt, og pumpehastighet er mulige feilkilder. Gode rutiner for synkronisering av tidspunkt for innsamling og lik og jevn pumpehastighet bidrar til å sikre prøvetakingene.

### Syntetisk DNA som sporstoff

I pilotforsøket fant vi at lave konsentrasjoner av sporstoff ga dårlig analysenøyaktighet. Mengden sporstoff må justeres etter det volum vann sporstoffet skal fordeles i. Likeledes må en ta hensyn til at det skjer et tap av sporstoff ut av merden ved bruk av skjørt.

Målenøyaktigheten varierte mellom forsøkene (fig 5). For pilotforsøket, forsøk 1 og forsøk 2 var spredningen som forventet ut fra konsentrasjon av sporstoff i prøvene (fig 2). Analysen fra forsøk 3 gav dårligere nøyaktighet enn forsøk 1 og 2 med en gjennomsnittlig standardfeil på 21,7% (fig. 5). Målenøyaktigheten ble heller ikke vesentlig bedre i prøver med høy sporstoffkonsentrasjon. Prøvene fra forsøk 3 ble analysert ved et annet laboratorium enn prøvene fra de første forsøkene, og vi antar at ulik laboratoriepraksis eller forskjell i målenøyaktighet mellom instrumentene kan være årsak til forskjellene i analyseresultat. I forhold til konsentrasjon av sporstoff i prøvene vurderes spredningen i måleverdiene mellom de tre parallelle delprøvene til å være akseptable. Det er derfor grunn til å anta at de forskjellene i konsentrasjoner som ble funnet i forsøkene er reelle.

En prøveserie ga blankt resultat (forsøk 4) ved PCR-analysen, og en prøveserie ga svært lave verdier (pilot). Normalt kontrolleres sporstoffet av leverandør før det sendes ut. En sjelden gang kan det skje at sporstoffet ikke fungerer etter hensikten. For å sikre seg mot dette anbefales det å tilsette to sporstoff med ulike DNA-sekvenser slik at disse kan analyseres separat. Det ekstra sporstoffet kan både være en reserve og en kontroll.

Saltvann ser ut til å hemme PCR-analysen. Dette kompenseres ved uttynning av prøvene før analyse. Også andre forhold kan virke hemmende på PCR-analysen. Undersøkelse av vannkvalitet i forkant kan gi viktig informasjon for analysepersonellet og bidra til å sikre kvaliteten på de videre analysene.

### 5.2 Lusetall

Ved alle forsøk ga badebehandlninga over 90% reduksjon av lus.(vedlegg 3). Dette ble sjekket med telling på 20 fisk hentet med hov i overflata både før og ca 14 dager etter avlusing. Dette er en vanlig prosedyre med åpenbare svakheter. Det er rimelig å anta at en ikke har tilfeldig fordeling av fisk i en merd. En har derfor bare et bilde av situasjonen i øvre del av merda før og etter avlusing. Et så lite utvalg som 20 fisk gir rom for tilfeldig variasjon.

### 5.3 Beregnet dose og resistens

I forsøk 3, hvor det ble nyttet skjørt som avskjerming, var konsentrasjon av pyretroider lavere enn forventet. Vann som strømmer inn gjennom åpning i bunnen og langs skjøter på skjørtet (fig. 4) forårsaket en fortykning av bademiddel. Mangel på kontroll med vannbevegelse inn og ut av behandlingsvolum ved bruk av skjørt blir forsøkt kompensert med tilsetning av mer virkestoff og økt behandlingstid. Det er imidlertid vanskelig å kvantifisere en slik kompensasjon. Dersom en slik kompensasjon ikke er tilstrekkelig vil en kunne få suboptimale doser i deler av eller hele behandlingsvolumet.

Ved bruk av skjørt med 10 meters dybde fant vi en sjiktning i konsentrasjon av sporstoff med høyere konsentrasjon av sporstoff i øvre del av merden enn i nedre del av merden (figur 8, tabell 7). Konsentrasjonen av sporstoff høyt oppe i merden avtok utover i behandlingsperioden. Fordeling av sporstoff og bademiddel i merda kan være påvirket av sjiktning i vannmassene. Saliniteten ble målt til 20‰ på 1m ved forsøk 3, mot ca 33‰ ved de andre forsøkene. Sjiktning i konsentrasjon kan også være et generelt bilde ved bruk av avskjerming med åpning i bunn, vi fikk lignende fordelingsbilde også i november (pilot).

Bruk av undervannskamera under forsøkene viste at fisk sto ned til 10 meters dyp. Uten opplining av nota til øvre deler av avskjermet volum vil det være vanskelig å oppnå lik dosering i hele behandlingsvolumet, og økt risiko for subletale doser i nedre deler av nota. Subletal dosering gir økt risiko for utvikling av resistens (Midttun m fl. 2000).

Ved bruk av presenning var konsentrasjon av sporstoff forholdsvis jevn i behandlingsvolumet. Det er det imidlertid stor variasjon i konsentrasjon av sporstoff mellom to avlusinger. Dette skyldes variasjon i behandlingsvolum. Dårlig kontroll med behandlingsvolum utgjør trolig største fare for suboptimal behandling ved bruk av presenning til avskjerming av nota (Treasurer m fl. 2000).

## 6 Konklusjon

Det ble foretatt fire forsøk med badebehandling, to med skjørt og to med presenning. Våre resultat indikerer at avlusning med presenning gir bedre fordeling av bademiddel i merden og en jevnt høyere konsentrasjon enn ved bruk av skjørt. Behandling med skjørt medfører mer ujevn og lavere dose enn forutsatt.

## 7 Oppsummering

Funn ved bruk av skjørt :

- Konsentrasjon av bademiddel innen ett sjikt varierte relativt mye tidlig i behandlingen. Forskjellene jevnet seg imidlertid ut i løpet av behandlingsperioden.
- Under fordelingen av bademiddel skjedde det en sjiktning. Beregnet konsentrasjon og dose av bademiddel var større høyt oppe i merda sammenlignet med dypere områder. Forskjellene ble mindre over tid.
- Bademiddel tapes ut av merda under avlusing. Dette registreres ved lavere konsentrasjoner av pyretroider enn teoretisk beregnet. Dette forholdet kompenseres ikke ved tilsetning av mer bademiddel sammenlignet med det som brukes ved behandling med presenning.

Funn ved bruk av presenning:

- Variasjon i konsentrasjon av bademiddelet i et horisontalt sjikt er relativt stor i det ene forsøket men ikke det andre.
- Vi fant ingen vertikal sjiktning av bademiddelet. For begge forsøkene med presenning var dosen av bademiddel lik høyt oppe som lenger ned i merda.
- Det var ingen tap av bademiddel ut av merda, men beregnede verdier av pyretroider varierte med størrelse på avskjermet volum.

## 8 Forslag til forbedring

Forslag til forbedring ved bruk av skjørt:

- Bademiddelet bør blandes i et større volum vann (stamløsning) og tilsettes spredt i hele overflatelaget i merden. Det er en fordel å lage en slik stamløsning i god tid før anvendelse for at bademiddelet skal spre seg fullstendig i stamløsningen.
- Fare for sjiktning av bademiddel medfører at en bør line opp nota under avlusing.
- Tap av bademiddel kan kompenseres ved tilsetning av bademiddel underveis i behandlingen. Dette kan gjøres ved tilsetning over en lengre periode eller ved å dele opp i flere tilsetninger. Konsentrasjon må da justeres slik at en unngår overdosering.

Forslag til forbedring ved bruk av presenning:

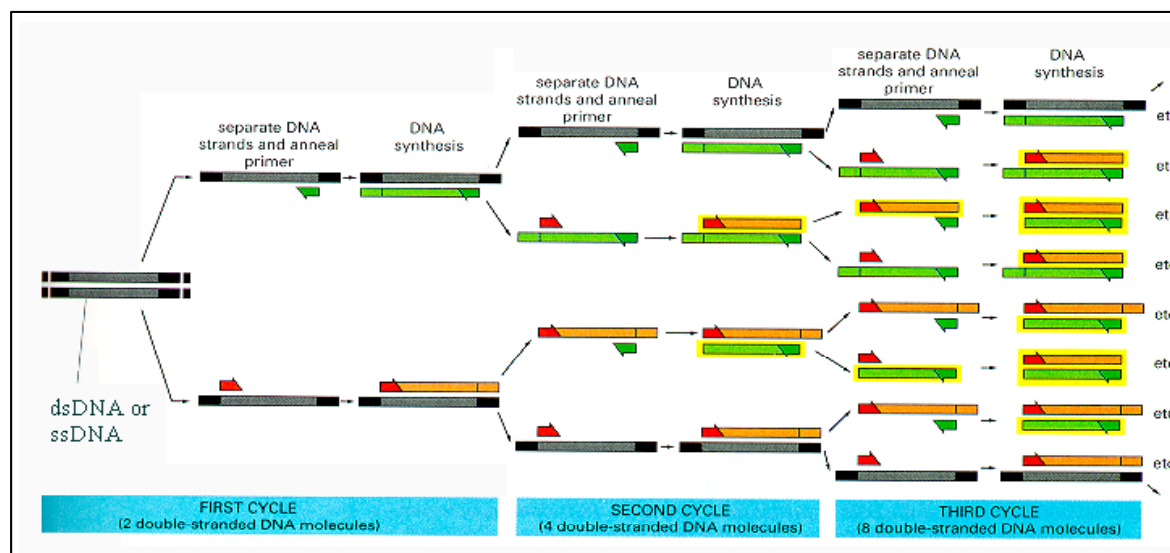
- Bademiddelet bør blandes i et større volum vann og tilsettes spredt i hele merden. Det er en fordel å lage en slik stamløsning i god tid før anvendelse for at bademiddelet skal spre seg fullstendig i stamløsningen.
- Uten vertikal sjiktning av bademiddel har det ingen hensikt å trenge fisken ved å line opp merda, mer en det som er praktisk for å sette presenningen. Ved bruk av presenning kan bademidlet spres i hele behandlingsvolumet av behandlingen. Dette vil gi jevnest mulig dosering. Muligheten for å nytte lavere dosering enn dagens praksis bør undersøkes
- Det bør utvikles metodikk som sikrer konstant volum ved bruk av presenning. Det vil sikre mot over eller underdosering, og kan gi mulighet til bruk av mindre bademiddel.

## 9 Referanser

- Betamax brukermanual 2002. Utgitt av Scanvacc AS Midtgar, Hvam pb 233, 2151 Årnes.
- Bruker veiledning Alphamax 1999, utgitt av Alparma AS Harbitzalleen 3, pb158 skøyen N-0212 OSLO.
- Devine J. D., I. Denholm, T.E. Horsberg 2000. Chemoterapeutant resistance in sea lice: What is it and what can be done about it? *Caligus* 6,12-14.
- Grave K., T.L. Lunestad., I. Litleskare, R.A. Medhus 2003. Forbruksstatistikk og rapportering av legemiddelbruk til oppdrettsfisk i Norge i årene 1998 – 2002. *Norsk Veterinærtidsskrift* 115: 443-446.
- Havforskningstema 1-2003*. Kampen mot lus på oppdrettsfisk: Løsningen ligger i genene. Havforskningsinstituttet.
- Jones M.W., Sommerville C., & Wooten R. (1992). Reduced sensitivity of the salmon louse, *Lepeoptheirus salmonis*, to the organophosphate dichlorvos. *Journal of Fish Diseases* 15: 197-202.
- Midttun B., S. Alexandersen, B. Martinsen 2000. Lakselus resistens mot pyretroider-kan den utsettes eller forhindres. Særtrykk, *Norsk Fiskeoppdrett* Nr 11.
- Midttun B., S. Alexandersen, B. Martinsen 2000b. Valg av strategi og metode med hovedvekt på badebehandling. Særtrykk, *Norsk Fiskeoppdrett* Nr 10.
- Norsk forskrift 2000-02-01 nr 70 (LD): Forskrift om bekjempelse av lakselus.
- Sevatdal S., Horsberg T.E. (2003). Determination of reduced sensitivity in sea lice (*Lepeoptheirus salmonis* Krøyer) against the pyrethroid deltametrin using bioassays and probit modelling. *Aquaculture* 218: 21-31.
- Sabir I.H., J. Torgersen, S. Haldorsen 1999, *Hydrogeology Journal* 7:264-267
- Sabir I.H., S. Haldorsen, J. Torgersen, P. Aleström, S. Gaut, H. Colleuille, T.S. Pedersen, N.O. Kitterød 2000. Synthetic tracers: examples of their application in water related studies. *Tracers and Modelling in Hydrogeology. IAHS publ.no.262.2000*
- Statens legemiddel kontroll (SLK) pub. 2000:2, *Terapi anbefaling*, Behandling mot lakselus i Oppdrettsanlegg. ISSN 1502-2692.
- Treasurer J.W., A. Grant, P.J.Davies 2000. Physical constraints of bath treatments of atlantic Salmon (*Salmo Salar*) with a sea lice burden (Copepoda:Caligidae). <http://dpc.uba.uva.nl/ctz/vol 69/nr 1/a14>. *Contribution to Zoology*, 69(1/2)(2000).

## Analyse av DNA-sekvenser brukt som sporstoff

Tradisjonell Polymerase Chain Reaction (PCR) er en enzymatisk amplifikasjonsmetode der en mengde av DNA under optimaliserte reaksjons- og temperatur/tid forhold spesifikt amplifiseres (kopieres opp) i en automatisert PCR maskin. Denne reaksjonen skjer i gjentatte temperatur/tid syklene med teoretisk dobling av antall DNA molekylene per syke. Dette gir amplifikasjonen en eksponentiell karakter slik at resultatet blir en enorm mengde av det spesifikke DNA molekylet relativt til utgangsmengden (teoretisk skal ett molekyl være tilstrekkelig, se figur under).



*En illustrasjon som viser mekanismen bak tradisjonell PCR. Hver PCR syke resulterer i en dobling av det spesifikke DNA molekylet. Startmaterialet kan være enten dobbeltrådet eller enkeltrådet DNA.*

Deteksjon og kvantitering av DNA sporstoff molekylene beskrevet her skjer ved hjelp av moderne kvantitativ PCR metodikk (qPCR). Prinsippet, eller metoden som her er benyttet for kvantitering av spesifikke DNA sporstoff molekylene baserer seg på nærværet av en komponent (TaqMAN™ probe) under PCR amplifikasjonen som vil fluorescere med en intensitet proporsjonal med økningen av mengden av det spesifikke DNA sporstoffet. Intensiteten på fluorescensen fra ukjente prøver etter et bestemt antall amplifikasjons syklene registreres så mot standarder av kjent konsentrasjon som er kjørt samtidig. PCR maskinen som ble benyttet for analyse av prøver var en ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

## Luseregistreringer

Lus er registrert etter standard tellemetode, lus er registrert på minimum 20 fisk ved hver registrering. Fisk er tatt opp med hov fra merdkanten.

Ved beregning av prosentvis reduksjon i antall lus er fastsittende stadier ved telling etter behandling ikke tatt med. Dette kan være lus som har kommet etter behandling (nypåslag).

Fast: Fastsittende stadier av lakselus, chalimus 1-4

Bev: Bevegelige lakselus, preadulte hann- og hunnlus

Ho: Kjønnsmodne hunnlus

Ha: Kjønnsmodne hannlus

Sk: Skottelus, *Caligus elongatus*

<b>Forsøk</b>	<b>Dato</b>	<b>Dato</b>	<b>fast</b>	<b>bev</b>	<b>ho</b>	<b>ha</b>	<b>sk</b>	<b>Sum</b>
	<b>behandl</b>	<b>lusetelling</b>						
Pilot (Skjørt)	27.11.02	27.11	0,25	0,51	1,63	0,33	0,06	2,78
		10.12	0,05	0,04	0,00	0,00	0,00	0,04
		% reduksjon						98,6
Forsøk 1 (presenning)	13.03.03	13.03	1,40	2,75	0,60	0,95	0,55	6,25
		31.03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,05
		% reduksjon						99,2
Forsøk 2 (presenning)	17.03.03	13.03	0,60	1,35	0,50	0,25	0,35	3,05
		31.03	0,00	0,00	0,1	0,00	0,00	0,1
		% reduksjon						96,7
Forsøk 3 (skjørt)	11.06.03	11.06	0,10	0,5	0,35	0,25	0	1,2
		22.06	0,10	0,12	0,00	0,00	0,00	0,12
		% reduksjon						90
Forsøk 4 (skjørt)	11.06.03	11.06	0	0,35	0,35	0,55	0	1,25
		22.06	0,06	0,1	0	0	0	0,1
		% reduksjon						92

## Gjennomsnitt av beregnede verdier deltametrin for hvert dyp og innsamlingstidspunkt

forsøk	dyp	Tid (minutt)	Gjnsnitt (ppb)	stdav	N
1	1	5	1,512	1,929	5
1	1	10	2,783	1,866	5
1	1	20	1,983	2,057	5
1	1	30	2,622	1,747	5
1	3	5	3,673	6,954	5
1	3	10	2,535	3,734	5
1	3	20	1,817	0,870	5
1	3	30	1,992	0,946	5
1	5	5	3,273	4,466	5
1	5	10	1,272	0,745	5
1	5	20	1,849	1,101	5
1	5	30	2,346	0,512	5
1	7	5	3,073	4,789	5
1	7	10	1,665	1,232	5
1	7	20	1,219	0,210	5
1	7	30	2,438	0,637	5
1	10	5	0,060		1
1	10	10	0,920		1
1	10	20	1,495		1
1	10	30	1,150		1
2	1	5	0,925	0,655	5
2	1	10	1,113	0,553	5
2	1	20	1,495	0,230	5
2	1	30	0,805	0,661	5
2	3	5	0,971	0,442	5
2	3	10	1,210	0,490	5
2	3	20	0,713	0,790	5
2	3	30	0,764	0,682	5
2	5	5	1,311	0,454	5
2	5	10	1,097	0,487	5
2	5	20	0,715	0,680	5
2	5	30	0,833	0,641	5
2	7	5	1,150	0,266	5
2	7	10	0,936	0,448	5
2	7	20	0,649	0,514	5
2	7	30	0,690	0,709	5
2	10	5	3,450		1
2	10	10	1,380		1
2	10	20	1,610		1
2	10	30	1,380		1
3	1	5	4,222	4,055	5
3	1	10	0,932	0,878	5
3	1	20	0,545	0,514	5
3	1	30	0,425	0,287	5
3	3	5	0,208	0,370	5
3	3	10	0,337	0,278	5
3	3	20	0,609	0,748	5
3	3	30	0,334	0,246	5
3	5	5	0,038	0,067	5
3	5	10	0,115	0,235	5
3	5	20	0,047	0,089	5
3	5	30	0,050	0,070	5
3	7	5	0,006	0,009	5
3	7	10	0,029	0,034	5
3	7	20	0,070	0,099	5
3	7	30	0,074	0,054	5
3	10	5	0,000		1
3	10	10	0,109		1
3	10	20	0,069		1
3	10	30	0,076		1