

Rola polydnawirusów w supresji odczynów odpornościowych owada

Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

* Zakład Patologii Owadów Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UMCS, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

Wrażliwość owadów na zakażenie zależy od wielu czynników. Całkowita niepodatność na zakażenie wieloma gatunkami drobnoustrojów, które występują w środowisku bytowania owada jest właściwością wrodzoną. Jest ona efektem obecności anatomiczno-fizjologicznych barier oraz istnienia całego zespołu mechanizmów obronnych, komórkowych i humoralnych, niedopuszczających do zakażenia oraz skutecznie likwidujących proces zakaźny w jamie ciała owada. Rozpoznanie wnikających do jamy ciała owada drobnoustrojów i pasożytów jako „struktur obcych” dla organizmu jest warunkiem koniecznym do uruchomienia odczynów odpornościowych. Duża sprawność mechanizmów rozpoznawania u owadów, w których biorą udział wyspecjalizowane typy hemocytów, lektyny, hemokiny i składowe układu polifenylksydazy, oraz efektywność hemocytarnych i humoralnych odczynów odpornościowych, nie wyklucza możliwości wymknięcia się spod kontroli układu immunologicznego drobnoustrojów, pasożytów i zmienionych patologicznie komórek i tkanek (14).

Mechanizmy ucieczki patogenów spod kontroli immunologicznej

Ucieczka patogena spod kontroli immunologicznej jest realizowana przez zmianę jego struktur powierzchniowych, selektywne niszczenie komórek układu odpornościowego lub substancji efektorowych odpowiedzi immunologicznej. Niekiedy sposobem ucieczki spod kontroli immunologicznej jest umiejscowienie się patogena w tkankach trudno dostępnych dla hemocytów i białek odpornościowych, czego egzemplifikacją jest zakażenie wirusowe układu nerwowego (10).

W patologii owadów do definiowania sposobów ucieczki patogenów spod kontroli immunologicznej gospodarza wprowadzono pojęcie oporu biernego (passive resistance to immunity) oraz oporu czynnego (active resistance to immunity) (4). Opór bierny, będący efektem silnej presji ewolucyjnej na patogeny, jest efektem zmian zachodzących w samym patogenie, których celem jest osłabienie lub całkowite wyłączenie kontroli immunologicznej gospodarza. Jest on realizowany przez molekularną mi-

mikrę, dymorfizm morfologiczny bakterii, występowanie fazy eklipsy w zakażeniach wirusowych, wytwarzanie otoczek parasporalnych przez wirusy poliedroz i granuloz, kolonizację przez pasożyta narządów gospodarza o utrudnionym dostępie dla hemocytów, zakażenie stadiów rozwojowych owada, w których reaktywność układu odpornościowego jest niska. Mikra polega na upodobnieniu markerów powierzchni komórki patogena do markerów obecnych na komórkach owada gospodarza dzięki czemu tak zmieniony patogen nie jest rozpoznawany jako „obcy” (18, 19).

Pasożyty dysponują też mechanizmami oporu czynnego. Wśród nich najważniejszą rolę odgrywa hamowanie komórkowych odczynów obronnych, takich jak fagocytoza, tworzenie otoczek i guzków oraz zaburzenie mechanizmów odporności humoralnej, w tym zaburzenie syntezy polipeptydów i białek odpornościowych lub ich niszczenie, a także dysfunkcja układu oksydazy polifenolowej. Efektem tego ostatniego działania jest utrudnione rozpoznanie immunologiczne lub jego brak. Do najlepiej poznanych czynników działających na substancje bakteriobójcze hemolimfy należą inhibitory immunologiczne typu A i typu B. Inhibitory immunologiczne typu A, o charakterze enzymów proteolitycznych, niszczą selektywnie polipeptydy i białka odpornościowe hemolimfy typu cekropin i attacyn u *Lepidoptera*, dipterycyn u *Diptera* i apidycyn u *Apidae* (10).

W inwazjach pasożytniczych człowieka i zwierząt wyższych często ma miejsce modyfikacja odpowiedzi immunologicznej gospodarza, przy czym w wielu przypadkach obserwuje się supresję układu odpornościowego. Właściwości immunosupresyjne posiadają m.in. niektóre gatunki *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Toxoplasma*, *Babesia*, *Schistosoma*, *Filaria*, *Plasmodium malariae*, *Trichinella spiralis* (5). Jaja i larwy błonkówek owadziarek i gąsieniczników (*Hymenoptera*), których larwy pasożytują w organizmie gąsienic motyli, wymykają się spod kontroli immunologicznej owada, w którym odbywają rozwój i dlatego nie są inkapsulowane. Ten brak inkapsulacji jest spowodowany immunosupresyjnym działaniem wirusów z rodziny *Polydnawiridae* pozostających w ścisłych związkach z endopasożytniczymi owadami z rodziny *Braconidae* i *Ichneumenidae*.

Inkapsulacja jako odczyn obronny w inwazjach pasożytniczych

Głównym mechanizmem obronnym uruchamianym w jamie ciała owada na inwazję pasożytów i ich jaj jest inkapsulacja. Proces ten polega na wytworzeniu otoczki zbudowanej z kilku lub nawet kilkudziesięciu warstw hemocytów wokół inkapsulowanego obiektu. Ściana otoczki jest utworzona przez plazmatocyty i hemocyty ziarniste, rolę mediatorów inkapsulacji spełniają cytokiny oraz polipeptydy i białka pełniące rolę adhezyn (21). Często wewnętrzna warstwa otoczki ulega melanizacji, sekwestrując w ten sposób ściśle inkapsulowane pasożyty od hemolimfy.

Pasożyty wykształciły rozmaite strategie w celu uniknięcia inkapsulacji. Obejmują one molekularną mimikrę oraz produkcję substancji, które po wprowadzeniu do jamy ciała owada wraz ze składanymi jajami pasożyta, upośledzają mechanizmy odporności. W przypadku asocjacji polydnawirusów z pasożytniczymi błonkówkami i gąsienicznikami ma miejsce ekspresja genomu wirusa w zakażonym organizmie gospodarza, co prowadzi do immunosupresji przejawiającej się brakiem rozpoznania jaj pasożyta jako substancji obcej oraz do upośledzenia lub całkowitego zahamowania inkapsulacji jaj i larw endopasożyta. O immunosupresji świadczy niszczenie hemocytów aktywnych w inkapsulacji oraz zmiana ich właściwości adhezyjnych do powierzchni jaj pasożyta. Zarodki oraz larwy endopasożytniczych błonkówek związanych z polydnawirusami, wymykając się spod kontroli immunologicznej, mogą normalnie rozwijać się w jamie ciała zakażonej gąsienicy, podczas gdy inne pasożyty i drobnoustroje są niszczone przez komórkowe i humoralne odczyny obronne.

Klasyfikacja i charakterystyka polydnawirusów

Polydnawirusy należą do rodziny *Polydnaviridae* (24). Część wirusa zawiera dwuniciowy DNA kolistego kształtu. W obrębie rodziny *Polydnaviridae* wyróżniono dwie odrębne grupy różniące się morfologią wirionu oraz swoistością względem gospodarza. Brakowirusy zakażają owady z rodziny *Braconidae* podczas gdy ichnowirusy występują u gąsieniczników (*Ichneumonidae*). Część brakowirusa zawiera nukleokapsyd kształtu cylindrycznego o średnicy 40 nm i zmiennej długości, która waha się od 30 do 150 nm. Nukleokapsydy pojedyncze lub w grupach otacza pojedyncza błona. Część ichnowirusów o wymiarach 85×330 nm mają kształt elipsoidalny, przy czym każdą cząsteczkę otacza podwójna błona (17).

Polydnawirusy replikują się wyłącznie w komórkach calyx (komórki usytuowane pomiędzy rureczkami jajnikowymi a jajowodami) jajników endopasożytniczych

Hymenoptera, zazwyczaj w późniejszych stadiach rozwoju poczwarkowego owada. Dojrzałe wiriony przedostają się do płynu wypełniającego calyx.

Cykl rozwojowy polydnawirusa

Cykl rozwojowy polydnawirusa obejmuje transkrypcję i replikację wirusa w organizmie wrażliwego gospodarza jakimi są owady z rodziny *Braconidae* i *Ichneumonidae*, których larwy pasożytują w gąsienicach wielu gatunków motyli oraz genetyczną kolonizację organizmu żywiciela. W cyklu rozwojowym wirusa uczestniczą dwie odrębne formy specyficznego wirusowego DNA. Replikacją i transmisją kieruje prowirus (wirus o genomie ściśle zintegrowanym z genomem gospodarza), podczas gdy genetyczna kolonizacja żywiciela endopasożytniczej błonkówki jakim jest gąsienica, odbywa się dzięki kolistym cząsteczkom wirusowego DNA. Zakażają one komórki gąsienicy podczas składania jajeczek przez gąsieniczniki lub błonkówki owadziarki (25, 26). Wraz z jajeczkami do jamy ciała gąsienicy przedostaje się płyn „calyx” zawierający cząsteczki polydnawirusa, białka wydzielane przez jajniki błonkówki, a ponadto u niektórych gatunków również wirusopodobne cząsteczki różniące się morfologicznie od polydnawirusa. Niektóre gatunki błonkówek owadziarek wraz ze składanymi jajeczkami wstrzykują do jamy ciała gąsienicy jad produkowane przez gruczoł jadowy. Podczas metamorfozy błonkówki polydnawirus replikuje się w komórkach calyx jajnika. Nowa generacja błonkówek opuszcza gąsienicę i przechodzi w stadium poczwarki. Porażone gąsienice wkrótce padają lub przeżywają kilka tygodni, jednakże ich rozwój ulega zahamowaniu.

Jakkolwiek wiriony polydnawirusów występują wyłącznie w układzie rozrodczym samic owadów z rodzin *Braconidae* i *Ichneumonidae*, to jednakże sekwencje wirusowego DNA są obecne także w genomie samców w formie prowirusa. Prowirus jest zintegrowany z chromosomami endopasożytniczego owada i jest przekazywany na następne generacje podczas zapłodnienia zgodnie z prawami Mendla (11). Transmisją i replikacją polydnawirusa kieruje linearny DNA, podczas gdy DNA kolistego kształtu otoczony błoną jest odpowiedzialny za genetyczną kolonizację owada żywiciela. Transkrypcja i translacja mRNAs kodowanych przez polydnawirusy odbywa się w komórkach ciała tłuszczowego, hemocytach, komórkach nabłonka jelita środkowego, cewkach Malpighiego i w układzie nerwowym gąsienicy (18, 26). Istotne znaczenie posiada fakt, że w zakażonej gąsienicy ma miejsce tylko specyficzna transkrypcja wirusa przy braku namnożenia wirusa. Wirus replikuje się wyłącznie w komórkach jajnika endopasożytniczych owadów (10, 14).

Mechanizmy immunosupresyjnego działania polydnawirusów

Specyficzne mechanizmy, za pośrednictwem których polydnawirusy działają supresyjnie na układ odpornościowy owadów porażonych przez endopasożytnicze błonkówki, nie są w pełni poznane. Nie wydaje się przy tym uzasadniona interpolacja obserwacji poczynionych na ssakach zakażonych przez wirusy niedoborów immunologicznych na owady zakażone polydnawirusem ze względu na odrębność układów immunologicznych u tych dwóch grup zwierząt (9). Zaburzenia inkapsulacji endopasożyta spowodowane przez polydnawirusy są następstwem upośledzenia aktywności hemocytów. Można też domniemywać, że polydnawirusy nie tylko uszkadzają bezpośrednio hemocyty, ale mogą upośledzać funkcje znanych modulatorów odporności owada, takich jak lektyny, eikozanoidy, ektopaminy i hemokiny. Nie można także wykluczyć możliwości, że polydnawirusy podobnie jak niektóre wirusy kręgowców, produkują aktywne substancje tzw. czynniki modulujące odpowiedź immunologiczną (molecular manipulators of the host immune response). W organizmie ssaków uczestniczą one aktywnie w przenoszeniu sygnałów wpływających na liczne funkcje komórek, w tym na ich przyleganie do substancji „obcej” i ruchliwość.

Działanie immunosupresyjne polydnawirusów dotyczy zasadniczo dysfunkcji hemocytarnych odczynów obronnych. Obejmuje ono w mniejszym stopniu zaburzenia mechanizmów odporności humoralnej owada. Udowodniono przy tym, że działanie immunosupresyjne polydnawirusów jest wspomagane przez płyn wypełniający calyx (Calyx fluid), teratocyty oraz jaja pasożytniczej błonkówki (17).

Badania jednoznacznie wskazują na działanie immunosupresyjne polydnawirusów, zwłaszcza we wczesnych stadiach zarażenia larwy owada. W niektórych przypadkach zahamowanie inkapsulacji jest ukierunkowane wyłącznie na jaja pasożyta, podczas gdy obiekty abiotyczne są inkapsulowane (7, 29). Edson i wsp. (8) po raz pierwszy wykazali, że oczyszczony ichnowirus hamuje inkapsulację i nodulację w jamie ciała gąsienicy. Stoltz i Guzo (23) oraz Davis i wsp. (7) ustalili, że przyczyną zahamowania inkapsulacji jaj i larw pasożytniczego owada było obniżenie właściwości adhezyjnych i ruchliwości plazmatocytów. Ten efekt supresyjny nie jest jednak następstwem bezpośredniego działania cytotoksycznego samego wirusa na plazmatocyty. Stwierdzono bowiem brak zahamowania zdolności adhezyjnej i ruchliwości plazmatocytów przez polydnawirus *Campoletis sonorensis*, podczas gdy taką właściwość posiada plazma hemolimfy larw *Heliothis virescens* porażonych przez endopasożytniczego owada *C. sonorensis* (7). Ponieważ ekspresja polydnawirusa w hemocytach, ciele tłuszczowym i innych tkankach owada porażonego

przez pasożyta ma miejsce dopiero po 4 godzinach od chwili złożenia jaj, efektu immunosupresyjnego nie można więc wiązać z białkami polydnawirusa syntetyzowanymi w zakażonym organizmie owada. Istnieją sugestie, że przynajmniej w przypadku brakowirusów immunosupresja we wczesnym okresie pasożytnictwa jest uwarunkowana przez płyn calyx zawierający duże ilości cząsteczek wirusa (16, 27, 29, 31, 32). Często immunosupresji towarzyszy zmiana formuły hemocytarnej, będąca efektem uszkodzenia tkanki hemopoetycznej (12). Obserwowano też bezpośrednio uszkodzenie układu odpornościowego owada przez płyn calyx oraz przez jad pasożytniczych os (33). W ciągu 8 godzin płyn calyx *Campoletis sonorensis* wprowadzony do jamy ciała 4 stadium larwy *Heliothis virescens* spowodował obniżenie populacji hemocytów aktywnych w tworzeniu otoczki o około 75% (7). Zmiany o podobnym charakterze występują po iniekcji do jamy ciała gąsienicy oczyszczonego polydnawirusa (1).

Immunosupresja indukowana przez polydnawirusy ma charakter przejściowy. U *Malacosoma disstria* zakażonej ichnowirusem związanym z *Hyposoter fugitivus* sprawność komórkowych odczynów odpornościowych powraca do normy po 1-2 dniach po wykluciu się larwy błonkówki z jaja. Reaktywowana odporność ma jednak charakter selektywny, ponieważ ulegają zniszczeniu w procesie fagocytozy i nodulacji bakterie wnikaające do jamy ciała owada, podczas gdy larwy endopasożytniczej błonkówki *H. fugitivus* nie są nadal inkapsulowane (22). Polydnawirusy hamują też ruchliwość i degranulację ziarnistości w granulocytach (28). Ross i Dunn (20) podali dowody wskazujące, że u gąsienic *Manduca sexta* porażonych przez *Catesia congregata* jest zaburzona nodulacja i fagocytoza bakterii.

Natomiast brak dowodów na hamujący wpływ polydnawirusów na poziom lizozymu hemolimfy i syntezę indukowalnych białek odpornościowych w organizmie larw owadów porażonych przez endopasożytnicze *Hymenoptera*. W hemolimfie porażonych owadów pojawiają się jednak nowe białka i polipeptydy jako efekt działania pasożyta na organizm gospodarza. Synteza tych białek jest skorelowana z zahamowaniem procesu inkapsulacji pasożyta. Część tych białek pojawia się w efekcie transkrypcji polydnawirusowego DNA, część zaś jest syntetyzowana przez rozwijającą się larwę pasożyta lub przez teratocyty (2, 13). Rola tych białek w unikaniu kontroli immunologicznej przez pasożyta nie jest jednak nadal wyjaśniona. Być może osłabiają one siły obronne gospodarza lub ułatwiają zakażenie komórek gospodarza przez polydnawirusy. U owadów bardzo często inkapsulacji pasożytów towarzyszy melanizacja otoczki. W tym procesie bierze udział układ profenylooksydazy. Zarówno brakowirusy jak i ichnowirusy, poprzez zaburzenie fizjologicznych czynności enocytoidów – komórek zaan-

gażowanych w produkcji i magazynowaniu profenylooksydazy, hamują melanizację (3).

Efektywne pasożytnictwo rozwijają endopasożyty z rodziny *Braconidae*, wówczas gdy brakowirusa wspomaga wydzielina gruczołu jadowego błonkówki. Taką rolę wspomagającą w zakażeniu ichnowirusami pełni płyn calyx (3, 32). Działanie immunosupresyjne polydnawirusów wspomagają też teratocyty – komórki powstające z błony embrionalnej zarodka pasożyta (6). Wydzielają one enzymy trawiące tkanki gospodarza i dostarczają składników odżywczych zarodkowi. Istnieją też sugestie (15, 30), że same teratocyty hamują inkapsulację. To działanie hamujące może być spowodowane zaburzeniami układu profenylooksydazy, a tym samym upośledzeniem mechanizmów rozpoznawania immunologicznego i melanizacji otoczki.

Działanie polydnawirusów zintegrowanych z endopasożytniczymi błonkówkami na organizm owada żywiciela jest wielokierunkowe. Nie dotyczy ono wyłącznie dysfunkcji układu odpornościowego żywiciela. W przebiegu inwazji występują zaburzenia hormonalne prowadzące do zahamowania wzrostu i rozwoju owada żywiciela, zaburzenia metabolizmu białek w ciele tłuszczowym oraz zaburzenia we właściwościach fizyko-chemicznych hemolimfy. Udziału tych zaburzeń w supresji hemocytarnych i humoralnych mechanizmów odporności owada nie można wykluczyć.

Piśmiennictwo

1. Asgari S., Smidr P.: *J. Insect Physiol.* 40, 789, 1994.
2. Beckage N. E., Kanost M. R.: *Insect Biochem. Molecular Biol.* 23, 643, 1993.
3. Beckage N. E., Metcalf J. S., Nesbit D. J., Schleifer K. W., Zetlan S. R., De Buron L.: *Insect Biochem.* 20, 285, 1990.

4. Boman H., Hulmark D.: *Ann. Rev. Microbiol.* 41, 103, 1987.
5. Cohen S.: *Survival of parasites in immunocompetent host.* W: *Immunology of parasitic infections.* Ed. Cohen S., Warren K. S. Blackwell Sci. Publ. Oxford, 138, 1982.
6. Dahlman D. L.: *Biological Control* 1, 118, 1990.
7. Davis D. H., Strand M. R., Vinson S. B.: *J. Insect Physiol.* 33, 143, 1987.
8. Edson K. M., Vinson S. B., Stoltz D. B., Summers M. D.: *Science* 211, 582, 1981.
9. Gliński Z., Jarosz J.: *Medycyna Wet.* 44, 394, 1988.
10. Gliński Z., Jarosz J.: *Zarys immunologii owadów.* Wyd. AR Lublin 1992.
11. Gotz P.: *Encapsulation in arthropods.* W: *Immunity in invertebrates.* Ed. Brehelin M. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 153, 1986.
12. Guzo D., Stoltz G. B.: *J. Insect Physiol.* 33, 19, 1987.
13. Harwood S. H., Beckage N. E.: *Insect Biochem. Molecular Biol.* 24, 685, 1994.
14. Jarosz J., Gliński Z.: *Leksykon immunologii owadów.* PWN, Warszawa 1996.
15. Kitano H.: *Bull. Tokyo Gakugei Univ. Sci.* 21, 95, 1969.
16. Kitano H.: *J. Insect Physiol.* 32, 269, 1986.
17. Lavine M. D., Beckage N. E.: *Parasitology Today* 11, 368, 1995.
18. Ratcliffe N. A., Gotz P.: *Res. Immunol.* 141, 919, 1990.
19. Ratcliffe N. A., Leonard C. M., Rowley A. F.: *Science* 226, 557, 1984.
20. Ross D. R., Dunn P. E.: *Dev. Comp. Immunol.* 13, 205, 1989.
21. Salt G.: *The cellular defense reactions of insects.* Cambridge Monogr. Exper. Biol. 16, Cambridge Univ. Press, Cambridge 1970.
22. Stoltz D. B.: *The polydnavirus life cycle.* W: *Parasites and Pathogens of Insects.* Ed. Beckage N. E., Thompson S. N., Federici B. A. Academic Press, San Diego NY. Boston. London, Sydney, Tykwo. Toronto, 167, 1993.
23. Stoltz D. B., Guzo D.: *J. Insect Physiol.* 32, 377, 1986.
24. Stoltz D. B., Krell P., Summers M. D., Vinson S. B.: *Intervirology* 21, 1, 1984.
25. Stoltz D. B., Vinson S. B.: *Can. J. Microbiol.* 23, 28, 1977.
26. Stoltz D. B., Vinson S. B.: *Adv. Virus Res.* 24, 125, 1979.
27. Stoltz D. B., Whitfield J. B.: *J. Hymenoptera Res.* 1, 125, 1992.
28. Strand M. R., Noda T.: *J. Insect Physiol.* 37, 839, 1991.
29. Tanaka T.: *J. Insect Physiol.* 33, 413, 1987.
30. Vinson S. B.: *J. Invertebr. Pathol.* 20, 118, 1972.
31. Vinson S. B.: *Parasitology* 68, 27, 1974.
32. Vinson S. B.: *Exp. Parasitol.* 41, 112, 1977.
33. Wago H., Tanaka T.: *Zool. Sci.* 6, 691, 1989.

Adres autora: prof. zwyczaj. dr hab. Zdzisław Gliński, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

GORDON P. J., DENNIS R.: Obrazowanie przy użyciu rezonansu magnetycznego celem przyżyciowego rozpoznania zaniku mózdzku u cielat rasy Holstein. (Magnetic resonance imaging for the ante mortem diagnosis of cerebellar hypoplasia in a Holstein calf). *Vet. Rec.* 137, 671–672, 1995 (26)

Cielę w wieku 6 tygodni rasy Holstein, u którego wystąpiły po porodzie ataksja i drgawki poddano obrazowaniu przy użyciu rezonansu magnetycznego oraz badaniom serologicznym. Badania serologiczne wykazały obecność w surowicy przeciwciał dla wirusa biegunki bydła (BVD). Serokonwersja może świadczyć albo o biernym przekazaniu przeciwciał przez matkę względnie o wczesnym zakażeniu wirusem BVD. Objawy kliniczne wskazywały na uszkodzenie mózdzku na tle zapalenia opon mózgowych względnie jego niedotlenienia. Badania przy użyciu rezonansu magnetycznego przeprowadzone w ogólnej narkozie (6 mg ksyłazyny, 120 mg ketaminy w iniekcji dożylniej, utrzymywane halotanem) wskazywały na rozległe uszkodzenie półkul mózdzku. Najlepsze efekty diagnostyczne uzyskano w badaniu w pozycji strzałkowej, w której był dobrze uwidoczony mózdzek i pień mózgu. Badanie sekcyjne potwierdziło wyniki obrazowania.

G.

RODGER H. D., TURNBULL T., SEULLION F. T., SPARROW D., RICHARDS R. H.: Syndrom śmierci nerwowej u hodowlanych łososi atlantyckich. (Nervous mortality syndrome in farmed Atlantic salmon). *Vet. Rec.* 137, 616–617, 1995 (24)

Syndrom śmierci nerwowej (NMS) odgrywa ważną rolę w hodowli łososi atlantyckich w Irlandii. Po raz pierwszy zdiagnozowano go w 1992 r. Corocznie zwiększa się zarówno liczba ferm, gdzie ten syndrom występuje jak i odsetek śmiertelności wśród chorych łososi. Program badawczy realizowany na jednej z ferm w 1993–1994 obejmował cotygodniowe badania histologiczne, wirusologiczne, bakteriologiczne i parazytologiczne, monitorowania fotoplanktonu, oznaczanie poziomu azotanów i azotynów, fosforanów oraz amoniaku w wodzie. W stanowisku A uprzednio już występował NMS, w stanowisku B choroba pojawiła się w 1994 r. a stanowisko C było wolne od NMS. Głównym objawem choroby był letarg, niekiedy pływanie łososi tuż pod lustrem wodnym, wyskakiwanie z wody. Po 2–3 dniach od chwili wystąpienia objawów ryby zaczęły padać. W 1993 r. śmiertelność przekroczyła 90%. Badanie histologiczne wykazało zwłóknienie i naciek komórek zapalnych w trzewiach. W mózgu i w rdzeniu kręgowym ryb ze stanowiska A i B występowały twory podobne do pasożytów (PLOS), rozsiane ogniska gliozy. PLOS występował w formie nitki, owalnych lub okrągłych tworów o średnicy 5–9 μm ułożonych w grona.

G.