©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 11 (1989) 47 - 54

International Laboratory for Research on Animal Diseases, Nairobi, Kenya (1)
Kenya Trypanosomiasis Research Institute, Kikuyu, Kenya (2)

In vitro-Assays zur Bestimmung der Medikamentenresistenz bei afrikanischen Trypanosomen*)

R. Kaminsky[1], E. Zweygarth[2], I. D. Gumm[1], F. Chuma[1]

Einleitung

In Afrika sind rund 40 Millionen Menschen auf einer Gesamtfläche von etwa 10 Mio. km^2 südlich der Sahara dem Risiko einer Trypanosomeninfektion, der Schlafkrankheit, ausgesetzt. Infektionen mit *Trypanosoma brucei brucei, T. congolense* und *T. vivax* stellen zudem eine fortwährende Bedrohung für die Tierproduktion in diesen tsetseverseuchten Gebieten dar. Die Bekämpfung der Trypanosomiasis stützt sich zur Zeit vor allem auf die Chemotherapie bei Mensch und Haustier und die Chemoprophylaxe bei den Haustieren.

Die intensive und oft auch unsachgemäße Anwendung der wenigen käuflich erhältlichen Trypanozide führte zu einem zunehmenden Auftreten von Trypanosomen-Stämmen mit einer ausgeprägten Resistenz gegen diese Arzneimittel (14, 15, 17). Allerdings wird der Begriff „Medikamentenresistenz" häufig benutzt, um ausbleibende therapeutische oder prophylaktische Behandlungserfolge zu erklären, obwohl die Existenz von Medikamenten-resistenten Stämmen nur eine von vielen möglichen Ursachen für eine nicht erfolgreiche Anwendung von Trypanoziden im Feld darstellt.

Um die Sensitivität von Trypanosomen-Stämmen gegenüber Arzneimitteln zu untersuchen, wird auch heute noch vor allem der klassische „Maus-Test" durchgeführt: Mäuse werden infiziert und anschließend mit unterschiedlichen Konzentrationen eines Medikaments behandelt. Die Anzahl der geheilten Mäuse bei der jeweiligen Medikamentenkonzentration gibt Hinweise auf die Arzneimittelsensitivität des betreffenden Trypanosomen-Stammes.

Ein wesentlicher Nachteil des Maus-Tests liegt darin, daß manche Trypanosomen-Spezies, wie *T. vivax* oder *T. simiae,* für Mäuse nicht infektiös sind. Außerdem wird in diesem Test eine hohe Anzahl von Labortieren verbraucht. Alternativen zu den Tierversuchen bieten Methoden zur in vitro-Kultivierung von Trypanosomen. Eine wachstumshemmende Wirkung von Trypanoziden auf Medikamenten-sensitive Trypanosomen in in vitro-Kulturen wurden von BOROWY et al. (1985) nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit sollen am Beispiel zweier Medikamenten-sensitiver und eines -resistenten *T. b. brucei*-Stammes verschiedene in vitro-Assays zur Unterscheidung von Arzneimittelresistenten und -sensitiven Trypanosomen vorgestellt werden.

*) Diese Arbeit ist die ILRAD-Publikation Nr. 684.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Material und Methoden

Trypanosomen-Stämme

Trypanosoma b. brucei ILTat (IL = International Laboratory for Research on Animal Diseases) 1.4 ist ein monomorpher Klon, der von dem Stamm EATRO (East African Trypanosomiasis Research Organization) 795 abstammt. Dieser Stamm wurde 1964 aus einem Rind in Uhembo (Kenya) isoliert. ILTat 1.4 ist äußerst virulent in Mäusen.

Trypanosoma b. brucei-Stamm CP (Chemotryp-Project) 547 wurde 1985 aus einer Kuh in Jilib (Somalia) isoliert.

Für Untersuchungen mit prozyklischen Formen wurde der *T. b. brucei*-Stamm CP 1154 benutzt, der 1982 aus einem Kamel in Korbesa (Kenya) isoliert wurde. Die Arzneimittelsensitivität dieser Stämme in Mäusen ist in Tabelle 1 dargestellt.

TABELLE 1
Sensitivität von *T. b. brucei*-Stamm ILTat 1.4, CP 547 und CP 1154 gegen Berenil ® und Samorin ® im Maus-Test.

Stamm	Berenil ®		Samorin ®	
	mg/kg	Anz. geheilt/ Anz. behandelt	mg/kg	Anz. geheilt/ Anz. behandelt
ILTat 1.4	3,5	8/8	1	8/8
CP 547	16	0/8	3	0/8
	50	0/8	10	5/8
CP 1154	6,3	8/8	3	5/5

Arzneimittel

Diminazenaceturat (Berenil ®, Hoechst AG, BRD) und Isometamidiumchlorid (Samorin ®, May and Baker, U.K.) wurden käuflich erworben. Alle angegebenen Konzentrationen für Berenil ® beziehen sich auf die aktive Substanz, Diminazeneaceturat. Die Medikamente wurden am jeweiligen Versuchstag in dreifach destilliertem Wasser gelöst.

Kulturmedien und Kulturbedingungen

Für Blutstromformen wurde ISCOVE's Medium (FLOW, Schottland, U.K.) mit folgenden Zusätzen verwendet (10): 0,1 mM Hypoxanthin, 0,075 mM Adenosin, 2 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, 50 µg Gentamycin/ml, 0,2 mM 2-Mercaptoaethanol (3) und 12% v/v Hitze-inaktiviertes fötales Kälberserum (FKS). Blutstromformen wurden in Kulturplatten (24-well culture plates, COSTAR, Cambridge, USA) oder in Kulturflaschen (T-25 culture flasks, COSTAR) im Medium bei 37° C und 4% CO_2 in Luft gezüchtet.

Für die Kultivierung von prozyklischen Formen wurde CUNNINGHAM's Medium (7) mit 10% FKS benutzt, dem HEPES-Puffer in einer Endkonzentration von 25 mM zugesetzt wurde (11). Kulturen von prozyklischen Formen wurden in Kulturflaschen (T-25 culture flasks, COSTAR) bei 27° C gehalten.

In vitro-Assays

a) Drug Incubation Infectivity Test (DIIT)

Der DIIT ist eine Kombination aus in vitro- und in vivo-Methoden: Etwa 2×10^5 Trypanosomen wurden in 1 ml Medium für 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Berenil ® oder Samorin ® inkubiert. Anschließend wurden je 0,8 ml der Trypanoso-

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

men-Suspension in Mäuse inokuliert und diese für 20 Tage 3 mal pro Woche auf Trypanosomen-Infektionen untersucht. Die Infektiosität der in vitro behandelten Trypanosomen wurde anschließend mit der von Kontroll-Kulturen verglichen.

b) Wachstumshemmungstest mit Blutstromformen

Blutstromformen wurden an ein Nährzell-freies Kultursystem adaptiert. Proben von Kulturen in logarithmischer Wachstumsphase wurden für 24 Stunden bei 37° C im Kulturmedium mit verschiedenen Konzentrationen von Berenil ® oder Samorin ® inkubiert. Anschließend wurde das Wachstum der Trypanosomen mit einem Coulter Counter bestimmt und die Anzahl der Generationen der Testkulturen mit denen von Kontrollkulturen, die ohne Medikament inkubiert wurden, verglichen. Die Ergebnisse wurden erstens graphisch dargestellt und zweitens wurden die EC_{50}-Werte (die Konzentration, die das Wachstum um 50% im Vergleich zu Kontrollkulturen hemmt) rechnerisch bestimmt.

c) Wachstumshemmungstest mit prozyklischen Formen

Proben aus prozyklischen Kulturen in logarithmischer Wachstumsphase wurden für 48 Stunden bei 27° C im Kulturmedium mit verschiedenen Konzentrationen von Berenil ® oder Samorin ® inkubiert. Die Wachstumsunterschiede wurden wie beim Wachstumshemmungstest mit Blutstromformen bestimmt.

Ergebnisse

DIIT (Drug Incubation Infectivity Test)

Der DIIT mit Berenil® zeigte, daß Trypanosomen des sensitiven Klons ILTat 1.4 nach Inkubation mit 0,05 µg Berenil®/ml nicht länger infektiös waren, während der resistente Stamm CP 547 auch noch nach Inkubation mit 1,00 µg Berenil ®/ml infektiös blieb (Tab. 2). Ähnlich verhielt es sich mit Samorin ®; eine Inkubation mit 0,001 µg Samorin®/ml war ausreichend, daß der sensitive Klon ILTat 1.4 im Gegensatz zum resistenten Stamm CP 547 seine Infektiosität verlor (Tab. 3).

TABELLE 2
Infektiosität von *T. b. brucei* ILTat 1.4 und CP 547 für Mäuse nach 24 Stunden Inkubation bei 37° C in Kulturmedium mit Berenil ®

Stamm	Berenil ® µ/ml			
	0	0,05	0,1	1
ILTat 1.4	4/4*	0/4	0/3	nd
CP 547	4/4	4/4	8/8	4/4

* = Anzahl infiziert/Anzahl inokuliert
nd = nicht durchgeführt

TABELLE 3
Infektiosität von *T. b. brucei* ILTat 1.4 und CP 547 für Mäuse nach 24 Stunden Inkubation bei 37° C in Kulturmedien mit Samorin ®

Stamm	Samorin ® µg/ml			
	0	0,001	0,01	0,05
ILTat 1.4	7/7*	0/7	0/7	0/7
CP 547	7/7	10/10	7/10	5/10

* = Anzahl infiziert/Anzahl inokuliert

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Wachstumshemmungstest mit Blutstromformen

Wie in Abbildung 1a zu erkennen ist, wurde das Wachstum des sensitiven ILTat 1.4 mit geringeren Konzentrationen von Berenil ® gehemmt als das vom resistenten CP 547. Auch die berechneten EC_{50}-Werte lagen mit 0,046 µg/ml Für ILTat 1.4 und 5,263 µg/ml für CP 547 um mehr als das 110fache auseinander. Für Samorin ® sind die EC_{50}-Werte nicht signifikant unterschiedlich, doch bei der graphischen Darstellung der Wachstumshemmung wird deutlich, daß Unterschiede zwischen dem sensitiven und dem resistenten Stamm vor allem nach Inkubation mit niedrigeren Konzentrationen von Samorin ® (<10µg/ml) auftreten (Abb. 1b).

Wachtumshemmungstest mit prozyklischen Formen

Das Wachstum von prozyklischen Formen wurde durch Berenil ® und Samorin ® gehemmt. Allerdings trat eine hemmende Wirkung von Berenil ® auf prozyklischee Formen erst bei Konzentrationen von mehr als 0,1 µg/ml Berenil ® auf. Unterschiede zwischem dem sensitven und dem resistenten Stamm waren nicht so ausgeprägt wie das für Blutstromformen der Fall war (Abb. 2a). Samorin ® jedoch zeigte schon bei einer Konzentration von 1 ng/ml eine trypanozide Wirkung auf prozyklische Formen. Das Wachstum des sensitiven ILTat 1.4 wurde im Vergleich zum resistenten CP 547 stärker gehemmt (Abb. 2b).

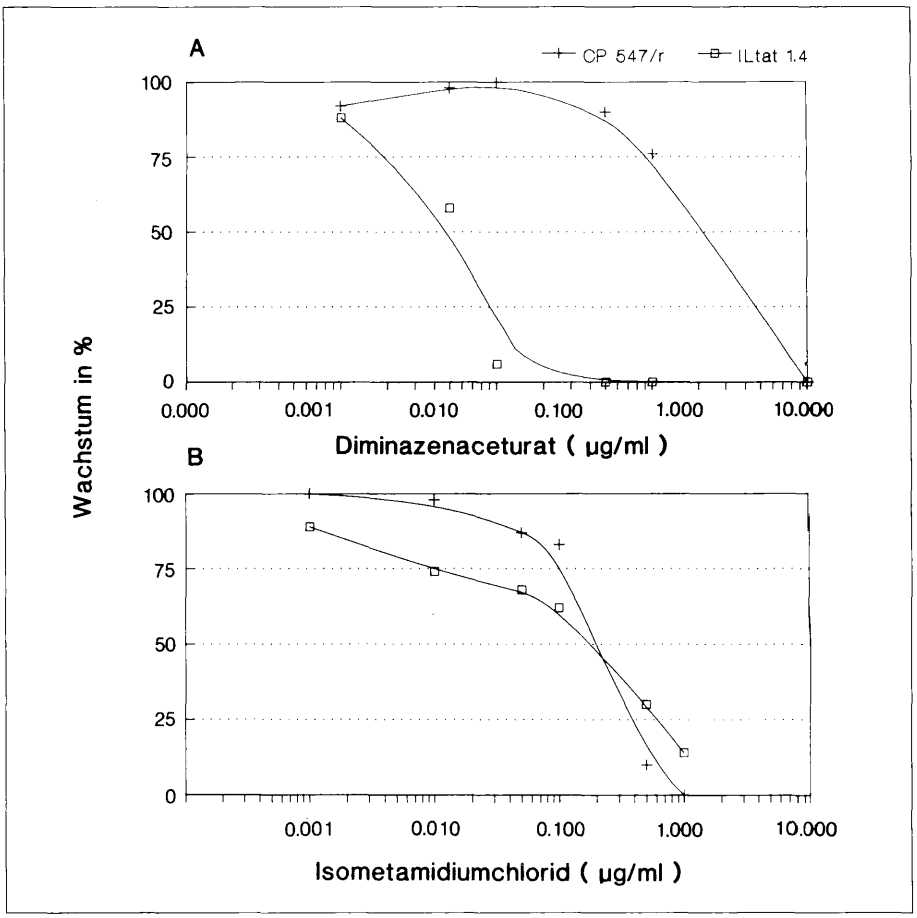

Abb. 1: Graphische Darstellung der Wachstumshemmung von *T. b. brucei* ILTat 1.4 und CP 547 nach 24 Stunden Inkubation bei 37° C in Kulturmedium mit Berenil ® (A) oder Samorin ® (B).

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

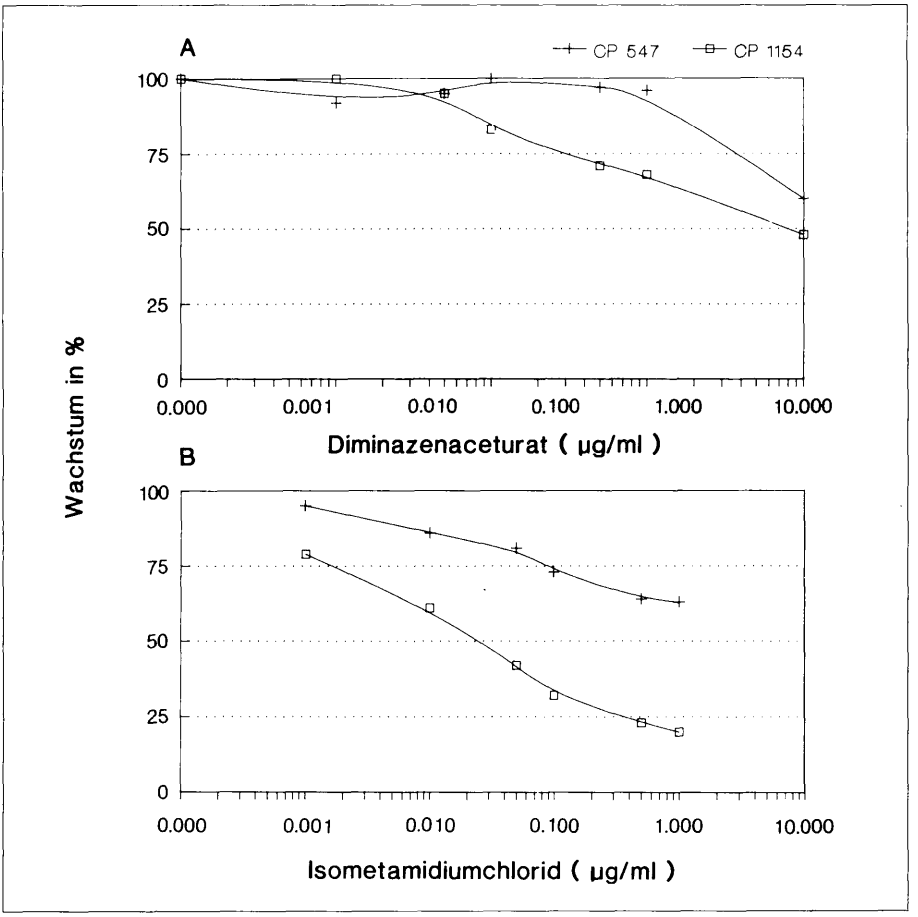

Abb. 2: Graphische Darstellung der Wachstumshemmung von prozyklischen *T. b. brucei* Stamm CP 1154 und CP 547 nach 48 Stunden Inkubation bei 37° C in Kulturmedium mit Berenil ® (A) oder Samorin ® (B)

Diskussion

Die gewonnenen Ergebnisse zeigen, daß in vitro-Methoden zur Unterscheidung von Medikamenten-resistenten und -sensitiven Trypanosomen-Stämmen geeignet sind: Bei der Adaptation von Trypanosomen blieb die Medikamentenresistenz nicht nur erhalten (5, 10), sondern konnte auch in verschiedenen in vitro-Assays gezeigt werden (Tab. 4). Mit dem DIIT konnten resistente von sensitiven Stämmen klar unterschieden (12) und Ergebnisse schneller gewonnen werden als im klassischen „Maus-Test". Der DIIT ist auch mit solchen *T. brucei* spp. möglich, die sich nicht oder nur schwer an in vitro-Bedingungen adaptieren lassen, da die meisten Trypanosomen-Stämme für 24 Stunden in vitro ohne Verlust ihrer Infektiosität kultiviert werden können. Allerdings müssen im DIIT immer noch Labortiere verwendet werden. Der Test ist nicht für *T. vivax* oder *T. simiae* geeignet, da diese Spezies für Mäuse nicht infektiös sind.

Die Unterscheidung von resistenten und sensitiven Trypanosomen in Blutstromform-Kulturen auf Grund unterschiedlicher Hemmungen des Populationswachstums durch Trypanozide war eindeutig möglich. Am Beispiel von Samorin® wurde deutlich, daß es notwendig ist, die Ergebnisse der Wachstumshemmung nicht nur rechnerisch als EC_{50}-

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

TABELLE 4
Übersicht von Assays zur Unterscheidung von Arzneimittel-resistenten und -sensitiven Tyrpanosomen
(Erläuterungen im Text)

Methode	Parameter	Zeit (Tage)
Standard „Maus-Test"	Heilung	30 - 60
DIIT (Drug Incubation Infectivity Test)	Infektiosität	1 + 20
Blutstromform-Kultur	Populationswachstum	1 + X
Blutstromform in markiertem Medium	Stoffwechsel	2 + XX
Prozyklische Formen in Kultur	Populationswachstum	2 + X
Blutstromformen — Prozykl. Formen	Transformation	2 - 7

X = Zeit, um Kulturen aus Blutproben zu etablieren
XX = Zeit, um Trypanosomen-Populationen heranzuzüchten

Wert, sondern auch graphisch darzustellen. Die physiologischen Konzentrationen von Samorin ® bei prophylaktischer Behandlung liegen im Blutplasma unter 10 ng/ml (13); bei dieser Konzentration wurden Unterschiede zwischen *T. b. brucei* lLTat 1.4 und CP 547 am deutlichsten (Abb. 1b). Der eigentliche Sensitivitäts-Test mit Blutstromformen dauert nur 24 Stunden, allerdings kann die Zeitspanne, die notwendig ist, um Trypanosomen aus dem Wirt an in vitro-Bedingungen zu adaptiern, 1 - 6 Wochen betragen, wobei manche Isolate sich überhaupt nicht in Kulturen ohne Nährzellen züchten lassen. Der Wachstumshemmungstest mit Blutstromformen ist nur mit *T. b. brucei, T. b. gambiense, T. b. rhodesiense, T. b. equiperdum* und *T. b. evansi* möglich, da zur Zeit nur diese Spezies als Blutstromformen ohne Nährzellen kultiviert werden können (3).

Eine Alternative liegt in in vitro-Assays, in denen Stoffwechselhemmungen von Blutstromformen durch Arzneimittel als Parameter zur Unterscheidung von resistenten und sensitiven Trypanosomen-Stämmen benutzt wird. So konnte z. B. der unterschiedliche Einbau von radioaktiv markiertem Hypoxanthin in Trypanosomen gemessen werden (6). Doch auch für diesen Test muß zunächst eine genügende Anzahl von Trypanosomen in vitro oder in vivo herangezüchtet werden. Darüberhinaus ist der Umgang mit radioaktivem Material in manchen Laboratorien nicht möglich. Stoffwechselhemmung ließe sich aber auch anders messen, wie z. B. zur Unterscheidung von resistenten und sensitven Plasmodien anhand des Einbaus von Bromdesoxyuridin (8).

Obwohl die Insektenformen von Trypanosomen normalerweise nicht den Arzneimitteln ausgesetzt sind, konnte eine trypanozide Wirkung von Medikamenten auf diese Formen festgestellt werden (1, 9, 16). Darüberhinaus konnten Unterschiede zwischen resistenten und sensitiven Stämmen in prozyklischen Kulturen gezeigt weden. Die Prüfung auf Resistenz gegen Samorin ® war in diesen Kulturen besser als gegen Berenil ® (Abb. 2a, b). Insektenformen bieten mehrere Vorteile gegenüber Blutstromformen: Erstens sind sie leichter zu kultivieren, zweitens sind auch als Blutstromformen schwierig zu kultivierende Spezies wie *T. congolense* in vitro mit guter Erfolgsquote in prozyklischen Formen zu transformieren und zu kultivieren, und drittens können Isolate direkt von der Tsetsefliege gewonnen werden.

In vitro-Assays können zur Unterscheidung von Medikamenten-resistenten und -sensitiven Trypanosomen benutzt werden, und es ist wünschenswert, daß potentielle Assays standardisiert und an einer größeren Anzahl von Trypanosomen-Isolaten geprüft werden. In vitro-Methoden haben gegenüber dem klassischen Arzneimittelsensitivitätstest in Mäusen den Vorteil, daß sie erstens auch für Trypanosomen-Spezies

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

geeignet sind, die für Mäuse nicht infektiös sind, und zweitens die Wirkung des Medikaments auf die Parasiten selbst direkt gemessen wird, ohne störende variable Faktoren wie Medikamenten-Verteilung, Medikamenten-Halbwertszeit, Bioverfügbarkeit oder unterschiedliches Verhalten von Trypanosomen in verschiedenen Wirtsspezies (2). Eine Verbesserung der Kulturbedingungen, sodaß Feldisolate schnell und mit großer Erfolgsquote an leicht zu handhabenden Kultursysteme adaptiert werden können, wird der nächste Schritt zur Entwicklung von in vitro-Assays zur Unterscheidung von Arzneimittel-resistenten und -sensitiven Trypanosomen-Isolaten sein.

Zusammenfassung

Die Medikamentenresistenz von *T. b. brucei* konnte in verschiedenen in vitro-Assays dargestellt werden, die in der Arbeit im Überblick vorgestellt werden. Mit dem DIIT (Drug Incubation Infectivity Test), einer Kombination von in vitro- und in vivo-Methoden, wurden resistente und sensitive Stämme auf Grund unterschiedlicher Infektiosität differenziert. Auch in Kulturen von Blutstromformen oder prozyklischen Formen war eine Differenzierung von resistenten und sensitiven *T. b. brucei* aufgrund unterschiedlicher Wachstumshemmung nach Inkubation von 24 oder 48 Stunden mit verschiedenen Arzneimittelkonzentrationen möglich. Vor- und Nachteile der jeweiligen Assays werden einander gegenübergestellt.

Schlüsselwörter

Trypanosoma brucei brucei, Medikamentenresistenz, in vitro-Assays, Blutstromformen, prozyklische Formen.

Summary

Determination of African trypanosome drug resistance by means of in vitro assays

The potential of in vitro assays for assessing trypanosome drug resistance is briefly reviewed. Herein we describe the use of Drug Incubation Infectivity Test (DIIT) in which resistant and sensitive trypanosomes can be distinguished by combining in vitro and in vivo techniques. Infectivity is compared after incubation with various drug concentrations. Also, resistant and sensitive *T. b. brucei* can be rapidly distinguished, as either bloodstream or procyclic forms, when propagatet axenically in vitro using a growth inhibition assay. Advantages and disadvantages of the assays are compared.

Key words

Trypanosoma brucei brucei, drug resistance, in vitro assays, bloodstream forms, procyclic forms.

Literatur

1. AGU, W., E. (1985):
Action of isometamidium chloride on the insect vector form of Trypanosoma vivax.
Res. Vet. Sc. 37, 376 - 377.

2. ALI, B. H., HASSAN, T. (1984):
Preliminary pharmacokinetic study of isometamidium chloride in camels.
Res. Vet. Sc. 37, 376 - 377.

3. BALTZ, T., BALTZ, D., GIROUD, C., CROCKETT, J. (1985):
Cultivation in a semi-defined medium of animal-infective forms of Trypanosoma brucei, T. equiperdum, T. evansi, T. rhodesiense and T. gambiense.
EMBO J. 4, 1273 - 1277.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

4. BOROWY, N. K., HIRUMI, H., WAITHAKA, H. K., MKOJI, G. (1985):
An assay for screening drugs against animal-infective bloodstream forms of Trypanosoma brucei brucei in vitro.
Drugs Exptl. Clin. Res. 11, 155 - 161.

5. BROWN, H. C., ROSS, C. A., HOLMES, P. H., LUCKINS, A. G., TAYLOR, A. M. (1987):
Adaptation of Trypanosoma congolense stocks to in vitro culture does not change their sensitivity to isometamidium.
Acta Trop. (Basel) 44, 373 - 374.

6. BRUN, R., KUNZ, C.:
In vitro drug sensitivity test for Trypanosoma brucei subgroup bloodstream trypomastigotes.
Acta Trop. (Basel) (im Druck).

7. CUNNINGHAM, I., (1977):
New culture medium for maintenance of tsetse tissues and growth of Trypanosomatids.
J. Protozool. 24, 325 - 329.

8. DOI, H., ISHII, A., SHIMONO, K. (1988):
A rapid in vitro assay system using anti-bromodeoxyuridin for drug susceptibility of Plasmodium falciparum.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 82, 190 - 193.

9. JEFFERIES, D., JENNI, L. (1987):
The effect of the trypanocidal drugs Berenil and Samorin on infections of Glossina morsitans centralis by T. congolense.
Acta. Trop. (Basel) 44, 369 - 370.

10. KAMINSKY, R., ZWEYGARTH, E. (1989):
Effect of in vitro cultivation on the stability of resistance of Trypanosoma brucei brucei to diminazene, isometamidium, quinapyramine and mel B.
J. Parasitol. 75, 42 - 45.

11. KAMINSKY, R., CUNNINGHAM, I., BEAUDOIN, E. (1986):
Verschiedene Methoden der in vitro Entwicklung metazyklischer Trypanosomen (Trypanosoma brucei brucei und T. b. rhodesiense).
Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 8, 163 - 171.

12. KAMINSKY, R., GUMM, I. D., ZWEYGARTH, E., CHUMA, F.:
A drug incubation infectivity test (DIIT) for assessing drug resistance in Trypanosomes.
Vet. Parasitol. (im Druck).

13. KINABO, L. D. B., BOGAN, J.. A. (1988):
Solid-phase extraction and ion-pair reversed-phase HPLC of isometamidium in bovin serum and tissues.
Acta Trop. (Basel) 45, 165 - 170.

14. LEACH, T. M., ROBERTS, C. J. (1981):
Present status of chemotherapy and chemoprophylaxis of animal trypanosomiasis in the eastern hemisphere.
Pharmacol. Therap. 13, 91 - 147.

15. MBWAMBO, H. A., MELLA, P. N. P., LEKAKI, K. A. (1988):
Berenil (diminazene aceturate)-resistant Trypanosoma congolense in cattle under natural tsetse challenge in Kibaha, Tanzania.
Acta Trop. (Basel) 45, 239 - 244.

16. MOLOO, S. K., KAMUNYA, G. W. (1987):
Suppressive action of Samorin in the cyclical development of pathogenic trypanosomes in Glossina morsitans centralis.
Med. Vet. Ent. 1, 285 - 287.

17. ROETTCHER, D., SCHILLINGER, D. (1985):
Multiple drug resistance in Trypanosoma vivax in the Tana River District of Kenya.
Vet. Res. 177, 557 - 558.

KORRESPONDENZADRESSE:

Dr. Roland Kaminsky
ILRAD

P.O.Box 30709 Nairobi · Kenya

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie

Jahr/Year: 1989

Band/Volume: 11

Autor(en)/Author(s): Kaminsky Ronald, Zweygarth E., Gumm I. D., Chuma F.

Artikel/Article: In vitro-Assays zur Bestimmung der Medikamentenresistenz bei afrikanischen Trypanosomen. 47-54