

6 ZUSAMMENFASSUNG - SUMMARY – RESUME

6.1 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Anwendung zweier Testsysteme zur Untersuchung der Medikamentenempfindlichkeit verschiedener *T. congolense*-Stämme aus Rindern der Provinz Kéné Dougou in Burkina Faso. Ziel war es, mit Hilfe von *T. congolense*-Referenzklonen den Standard-Maustest (*in-vivo*-Test) und den „Drug Incubation Infectivity Test“ (Kombination aus *in-vivo* und *in-vitro*-Test) für *T. congolense* zu etablieren und zu validieren und mit Hilfe dieser Tests die Trypanozidempfindlichkeiten verschiedener *T. congolense*-Stämme gegenüber Isometamidiumchlorid (Samorin[®], Trypamidium[®]) und Diminazenaceturat (Berenil[®]) zu untersuchen. Die *T. congolense*-Stämme stammten aus Primärisolaten, die zum einen in früheren Projekten in Samorogouan und zum anderen bei Feldstudien zur Untersuchung der Bedeutung der Medikamentenresistenz auf die Produktivität des Nutztierbestandes gewonnen wurden. (Forschungsprojekt „Epidemiology of drug resistance of animal trypanosomes in West Africa“, BMZ Special Project).

Vier *T. congolense*-Referenzklone (IL 1180, IL 2642, IL 3000, IL 3338) mit bekannter Isometamidium- und Diminazenempfindlichkeit wurden im Standard-Maustest (SMT) und „Drug Incubation Infectivity Test“ (DIIT) überprüft. Konzentrationen von 1 mg/kg im SMT und 50 ng/ml im DIIT konnten zwischen isometamidiumsensitiven und isometamidiumresistenten *T. congolense*-Klonen unterscheiden. Im Bezug auf Diminazen konnten bei Konzentrationen von 14 mg/kg im SMT und 5 µg/ml im DIIT diminazensensitive und diminazenresistente *T. congolense*-Klone voneinander unterschieden werden. Der Klon IL 2642 konnte sowohl im SMT als auch im DIIT in Hinsicht auf seine Diminazenempfindlichkeit nicht eindeutig charakterisiert werden.

Sechzehn verschiedene *T. congolense*-Stämme aus Primärisolaten aus der Provinz Kéné Dougou wurden im SMT und DIIT untersucht und mit Hilfe der Referenzwerte der *T. congolense*-Klone charakterisiert. Mit Ausnahme eines Stamms (SA 53) waren alle untersuchten *T. congolense*-Populationen im SMT und im DIIT sowohl resistent gegenüber Isometamidium, als auch (so fern untersucht) gegenüber Diminazen.

Vier der *T. congolense*-Stämme (SA 53, SA 267, SA 268 und SA 95) stammten aus dem Dorf Samorogouan in Kéné Dougou, und waren zwischen 1982 bis 1998 aus Rindern isoliert

worden. Die in *Mastomys* ermittelte Isometamidium- und Diminazenresistenz dieser Trypanosomenpopulationen waren vergleichbar mit den aus der Literatur bekannten Medikamentenempfindlichkeiten in Rindern. Es konnte gezeigt werden, dass in Samorogouan über einen Untersuchungszeitraum von 16 Jahren hinweg resistente Trypanosomenpopulationen vorhanden waren.

Zwölf *T. congolense*-Stämme stammten aus dem Forschungsprojekt „Epidemiology of drug resistance of animal trypanosomes in West Africa“ (BMZ Special Project). Vier der Trypanosomenpopulationen (DRI 18, SRI 92, SBA 1640 und SBA 1642) wurden 1998 in der Querschnittsstudie isoliert und waren im SMT und DIIT sowohl isometamidium- als auch diminazenresistent. Weitere acht untersuchte *T. congolense*-Stämme stammten aus der Blockbehandlungsstudie (1998-1999), die vor der Isometamidiumblockbehandlung isoliert worden waren. Drei der Stämme (MBI 2050, TBU 2130, SRI 2179) stammten aus Rindern, bei denen die Isometamidiumbehandlung erfolgreich war. Es wurde deshalb angenommen, dass diese Stämme isometamidiumsensitiv sind. Im SMT und im DIIT wurden sie jedoch eindeutig als isometamidiumresistent charakterisiert. Es scheint, dass die Nachweisgrenze der in den Felduntersuchungen verwendeten parasitologischen „Buffy Coat Technik“ nicht empfindlich genug war, um Trypanosomeninfektionen im Anschluss an die Isometamidium-Blockbehandlung festzustellen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die beiden untersuchten Testsysteme, Standard-Maustest und „Drug Incubation Infectivity Test“, zur Beurteilung der Medikamentenempfindlichkeit von *T. congolense* geeignet sind. Mit Ausnahme von Klon IL 2642 und Stamm SA 53, deren Empfindlichkeit für Diminazen nicht eindeutig war, konnten alle in dieser Arbeit untersuchten *T. congolense*-Referenzklone und -stämme in Bezug auf ihre Isometamidium- und Diminazenempfindlichkeit charakterisiert werden. Es wurden vergleichbare Ergebnisse mit beiden Methoden erzielt. So zeigten im SMT trypanozidsensitive *T. congolense*-Klone und -stämme im DIIT nach Inkubation eine reduzierte Infektiosität für *Mastomys*, während dagegen die im SMT trypanozidresistenten Trypanosomenklone und -stämme im DIIT für *Mastomys* infektiös blieben. Der DIIT ist durch die *in-vitro* Phase methodisch sehr aufwendig, so dass zur Überprüfung einer größeren Anzahl von *T. congolense*-Stämmen der SMT einfacher und praktikabler in der Anwendung ist. Bis zur Einführung eines routinemäßig einsetzbaren, reinen *in-vitro*-Testverfahrens, ist der SMT für *T. congolense*-Populationen aus Primärisolaten der geeignetere Test zur Überprüfung der Trypanozidempfindlichkeit.

6.2 Summary

This dissertation describes the application of two test systems with the purpose of examining the drug sensitivity of various *T. congolense* stocks in cattle originating from the province of Kéné Dougou in Burkina Faso. Its objective was to establish and validate the Standard Mouse Test (in-vivo test) and the Drug Incubation Infectivity Test (a combination of *in-vivo* und *in-vitro* test) for *T. congolense* with the help of *T. congolense* reference clones and, using these assays, to examine drug susceptibility of various *T. congolense* stocks with respect to isometamidium chloride (Samorin[®], Trypamidium[®]) and diminazene aceturate (Berenil[®]). The *T. congolense* stocks originated from primary isolates collected in both former projects in Samorogouan and from field studies that examined the impact of drug resistance on the productivity of domestic livestock (Research project „epidemiology of drug resistance of animal trypanosomes in West Africa“, BMZ Special Project).

Four *T. congolense* reference clones (IL 1180, IL 2642, IL 3000, IL 3338) with known isometamidium and diminazene sensitivity were evaluated in the Standard Mouse Test (SMT) and Drug Incubation Infectivity Test (DIIT). Concentrations of 1 mg/kg in the SMT and 50 ng/ml in the DIIT (reference values) were shown to be effective to differentiate between isometamidium-sensitive and isometamidium-resistant *T. congolense* clones. For diminazene concentrations of 14 mg/kg in the SMT and 5 µg/ml in the DIIT could distinguish between diminazene-sensitive and diminazene-resistant *T. congolense* clones. For the clone IL 2642 no classification was possible with respect to diminazene in both assays, SMT and DIIT.

Sixteen different *T. congolense* stocks from primary isolates originating from the province of Kéné Dougou were examined in the SMT and the DIIT, and characterised with the help of the evaluated reference values of drug-resistant and drug-sensitive *T. congolense* clones. With the exception of one stock (SA 53) all examined *T. congolense* populations in the SMT and the DIIT were resistant both with respect to isometamidium and (as far as examined) with respect to diminazene.

Four of the *T. congolense* stocks (SA 53, SA 267, SA 268 and SA 95) originated from the village of Samorogouan in Kéné Dougou and had been isolated from cattle between 1982 and 1998. The isometamidium and diminazene resistance of these trypanosome populations found in *Mastomys* were comparable with published drug sensitivities in cattle. It could be demonstrated that resistant trypanosome populations were present in Samorogouan during an examination period of 16 years.

Twelve *T. congolense* stocks originated from the research project „epidemiology of drug resistance of animal trypanosomes in West Africa“ (BMZ Special Project). Four of these trypanosome populations (DRI 18, SRI 92, SBA 1640 and SBA 1642) had been isolated in the cross-sectional study in 1998 and were both isometamidium- and diminazene-resistant in the SMT and the DIIT. The other eight examined *T. congolense* stocks originated from the block-treatment study (1998-1999). Three of these (MBI 2050, TBU 2130, SRI 2179) were collected from cattle, for which the isometamidium block-treatment had been successful. Hence it was assumed that these stocks were isometamidium-sensitive. However in the SMT and DIIT they were characterised as isometamidium-resistant. Apparently the parasitological detection method „Buffy Coat Technique“, which had been used in the field trials, was not sensitive enough to detect trypanosome infections following isometamidium block-treatment.

The results of this study show that both assays examined, the Standard Mouse Test and the Drug Incubation Infectivity Test, are suitable for the evaluation of drug sensitivity of *T. congolense*. With the exception of one clone (IL 2642) and one *T. congolense* stock (SA 53), whose sensitivity for diminazene could not be classified, all examined *T. congolense* reference clones and stocks could be characterised with respect to their isometamidium and diminazene sensitivity. A comparison of both tests showed that the results of the SMT corresponded with the results of the DIIT. *T. congolense* clones and stocks that were drug-sensitive in the SMT showed a reduced infectivity for *Mastomys* in the DIIT whereas trypanosome clones and stocks that were drug-resistant in the SMT retained their infectivity for *Mastomys* in the DIIT. Due to its *in-vitro* phase the DIIT is very laborious. For an evaluation of multiple *T. congolense* stocks the SMT is more simple and practicable in use. Prior to the introduction of a pure *in-vitro* test that can be applied on a routine basis the SMT is the more suitable assay for the evaluation of drug sensitivity for *T. congolense*.

6.3 Résumé

Ce travail décrit l'utilisation de deux techniques destinées à déterminer la sensibilité de plusieurs souches de *T. congolense* chez des bovins originaires de la province de Kéné Dougou au Burkina Faso. Son objectif était d'établir et de valider le Test Standard sur souris (test *in-vivo*) et le Test d'Infectiosité sous Incubation Médicamenteuse (« Drug Incubation Infectivity Test » une association de test *in-vivo* et *in-vitro*) pour *T. congolense* en utilisant des clones de référence de *T. congolense*, et aussi d'utiliser ces Tests pour évaluer la sensibilité de plusieurs souches de *T. congolense* vis à vis du chlorure d'isoméтамidium (Samorin[®], Trypamidium[®]) et de l'acéturate de diminazène (Berenil[®]). Les souches de *T. congolense* provenaient d'isolats primaires prélevés au cours de deux projets précédents à Samorogouan et d'études terrain destinées à déterminer l'impact de la chimiorésistance sur la productivité du cheptel bovin domestique (Projet de Recherche «Epidémiologie des chimiorésistances chez les trypanosomes en Afrique de l'Ouest», Projet Spécial BMZ).

Quatre clones de référence de *T. congolense* (IL 1180, IL 2642, IL 3000, IL 3338) ayant une sensibilité connue à l'isoméтамidium et au diminazène ont été testées avec le Test Standard Souris (SMT) et avec le Test d'Infectiosité sous Incubation Médicamenteuse (DIIT). Des concentrations de 1 mg/kg pour le SMT et de 50 ng/ml pour le DIIT (valeurs de référence) ont permis de différencier les clones de *T. congolense* sensibles à l'isoméтамidium de ceux qui y sont résistants. Pour le diminazène, des concentrations de 14 mg/kg pour le SMT et de 5 µg/ml pour le DIIT ont permis de différencier les clones de *T. congolense* sensibles au diminazène de ceux qui y sont résistants. Aucune classification n'a été possible pour le clone IL 2642 en ce qui concerne le diminazène avec les deux méthodes SMT et DIIT.

Seize souches distinctes de *T. congolense* issues d'isolats primaires provenant de la province de Kéné Dougou ont été examinées avec le SMT et le DIIT, puis caractérisées avec les valeurs de référence déterminées de clones de *T. congolense* chimiosensibles et chimio-résistants. A l'exception d'une souche (SA 53), toutes les populations de *T. congolense* analysées avec le SMT et avec le DIIT ont été trouvées résistantes à la fois à l'isoméтамidium et au diminazène.

Quatre des souches de *T. congolense* (SA 53, SA 267, SA 268 et SA 95) provenaient du village de Samorogouan dans le Kéné Dougou et avaient été isolées sur des bovins entre 1982 et 1998. Les résistances à l'isoméтамidium et au diminazène des populations de trypanosomes trouvées à *Mastomys* étaient comparables avec les chimiosensibilités chez

les bovins déjà publiées. Il a pu être démontré que des populations de trypanosomes résistants étaient présentes à Samorogouan pendant une période d'observation de 16 années.

Douze souches de *T. congolense* provenaient du Projet de recherche «Epidémiologie des chimiorésistances chez les trypanosomes en Afrique de l'Ouest», Projet "Spécial BMZ. Quatre de ces populations de trypanosomes (DRI 18, SRI 92, SBA 1640 et SBA 1642) avaient été isolées au cours d'une enquête transversale en 1998 et étaient à la fois résistantes à l'isométymidium et au diminazène avec le SMT et avec le DIIT. Les huit autres souches de *T. congolense* examinées provenaient d'une étude de traitement par bloc (1998-1999). Trois d'entre elles (MBI 2050, TBU 2130, SRI 2179) avaient été prélevées sur des bovins, pour lesquels le traitement par bloc à l'isométymidium avait réussi. Il en avait donc été déduit que ces souches étaient sensibles à l'isométymidium. Cependant elles furent caractérisées comme résistantes à l'isométymidium avec le SMT et avec le DIIT. Apparemment le diagnostic parasitologique par la méthode des couches leucocytaires qui avait été utilisée dans les essais terrain n'était pas assez sensible pour détecter les infections à trypanosomes faisant suite à un traitement par bloc à l'isométymidium.

Les résultats de ce travail montrent que les deux Tests examinés, le Test Standard sur souris et le Test d'Infectiosité sous Incubation Médicamenteuse, conviennent pour l'évaluation de la sensibilité de *T. congolense*. A l'exception d'un clone (IL 2642) et d'une souche de *T. congolense* (SA 53), dont la sensibilité au diminazène n'a pas pu être catégorisée, tous les clones et souches de référence de *T. congolense* examinés ont pu être catégorisés selon leur sensibilité à l'isométymidium et au diminazène. La comparaison des deux tests a démontré que les résultats du SMT correspondent à ceux du DIIT. Les clones et les souches de *T. congolense* chimiosensibles avec le SMT ont montré une infectiosité réduite pour *Mastomys* avec le DIIT alors que les clones et souches de trypanosomes chimio-résistants avec le SMT conservaient leur infectiosité pour *Mastomys* avec le DIIT. La mise en œuvre du DIIT est très compliquée du fait de sa phase *in-vitro*. Le SMT est plus simple et plus pratique à utiliser dans le cas d'une évaluation de plusieurs souches de *T. congolense*. Tant qu'un test purement *in-vitro* ne sera pas utilisable en routine, le SMT reste le test le plus convenable pour l'évaluation de la chimiosensibilité pour *T. congolense*.

7 ANHANG

7.1 Verwendete Medien, Lösungen, Materialien und Geräte

7.1.1 Medien

Minimum Essential Medium (MEM)

Mit Earle's Salzen, 2,2 g/l NaHCO₃, 25 mM Hepes, ohne Glutamin

Das Medium wurde als fertige Lösung von der Firma GIBCO (Katalognr. 32360, 500 ml) bezogen.

MEM mit Zusätzen

MEM	500	ml
MEM non essentiell amino acid (100x)	5,0	ml
L-Glutamin (2mM)	0,146	g
Glucose	1,6	g

Der pH-Wert wurde mit 4 N NaOH-Lösung auf 7,38 eingestellt. Das Medium wurde anschließend sterilfiltriert (0,2 µm), portioniert und im Kühlschrank aufbewahrt.

MEM modifiziert nach BALTZ

MEM mit Zusätzen

2-Mercaptoethanol	0,2	mM
Natriumpyruvat	2,0	mM
Hypoxanthin	0,1	mM
Thymidin	0,016	mM

Iscove's Modifiziertes Dulbecco Medium (IMDM)

flüssig, mit NaHCO₃, mit Glutamin (GIBCO, 21980, 500 ml)

IMDM mit Zusätzen: (modifiziert nach HIRUMI und HIRUMI, 1991)

IMDM	1	l
Bathocuproine disulphonic acid	0,028	g
L-Cystein	0,181	g
Hypoxanthin	0,068	g
Natriumpyruvat	0,11	g
Thymidin	0,039	g
Glutamin	0,292	g
2-Mercaptoethanol	0,009	g

7.1.2 Puffer

Earle's Balanced Salt Solution (EBSS)

Ca²⁺ und Mg²⁺ frei, ohne NaHCO₃, 10x

Die konzentrierte EBSS wurde durch Zugabe von Aqua bidest. verdünnt.

EBSS (10x)	100	ml
Aqua bidest.	900	ml
HEPES	25	mM

Die gebrauchsfertige Lösung wurde mit 4 N NaOH-Lösung auf pH 8,0 eingestellt, sterilfiltriert (0,2 µm) und portioniert im Kühlschrank gelagert.

Phosphate-buffered-Saline-Glucose-Lösung (PSG)

Die PSG-Lösung wurde aus einer PS-Stammlösung durch Zugabe von Glucose hergestellt und in einem bestimmten Verhältnis mit Aqua bidest. verdünnt.

PS-Stammlösung

Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	17	g
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,78	g
NaCl	4,25	g
Aqua bidest.	ad.	1000 ml

Der pH-Wert der Lösung wurde mit H₃PO₄ auf 8.0 eingestellt.

PSG-Gebrauchslösung: Verhältnis 4:6, 2,5% Glucose

PS-Stammlösung	400	ml
Aqua bidest.	600	ml
Glucose	25	g

Die Gebrauchslösung wurde sterilfiltriert (0,2 µm) und im Kühlschrank aufbewahrt.

7.1.3 Sonstige Lösungen

Trypanosomeneinfriermedium

EBSS-Gebrauchslösung	70	ml
Glycerin	30	ml

Das Einfriermedium wurde zu gleichen Teilen mit trypanosomenhaltigem Blut / Nährmedium vermischt, so daß eine Glycerinendkonzentration von 15% entstand.

Heparinlösung

EBSS-Gebrauchslösung	9,9	ml
Liquimin [®] 25 000 I.E.	0,1	ml

Zur Gerinnungshemmung waren 10 I.E. je Milliliter Blut nötig.

WALKER-Lösung

MgSO ₄ x 7 H ₂ O	9,0	g
Tris	0,1	g
Glycerin	9,0	ml
Aqua bidest	ad. 100	ml

Die WALKER-Lösung wurde sterilfiltriert (0,45µm), in kleine Mengen abgefüllt und kühl (4°C) gelagert.

Zellulose für mAECT

(„pre-swollen microgranular anion exchanger, DE 52, diethyl-aminoethyl cellulose“, Whatman)

1 Volumenanteil Zellulose wurde mit 2 Volumenanteilen PS-Stammlösung verrührt und für 30 Minuten ruhen gelassen. Nach Abnahme des Überstandes wurde erneut mit PS-Stammlösung aufgefüllt und ein weiteres Mal stehen gelassen. Es folgten zwei weitere

Waschvorgänge und anschließend wurde der pH auf 8,0 eingestellt. Die Zellulose wurde bei 120 °C autoklaviert, nachfolgend zweimal mit PSG-Puffer gewaschen und im Kühlschrank gelagert.

Färbung nach GIEMSA

Zur Bestimmung der Trypanosomenart von neu isolierten Trypanosomenpopulationen wurden Blutausstriche nach GIEMSA gefärbt.

GIEMSA-Gebrauchslösung

GIEMSA-Stammlösung	1,0	ml
Puffer nach Weise	9,0	ml

Die Blutausstriche wurden an der Luft getrocknet, für 5 Minuten mit Methanol fixiert, anschließend 40 Minuten mit der GIEMSA-Gebrauchslösung gefärbt und im Wasserstrahl gewaschen. Nach sorgfältiger Trocknung wurden die Ausstriche im Mikroskop (Öbobjektiv 100 x) untersucht.

7.1.4 Chemikalien

Chloroform	Merck, Darmstadt
Diethyl–aminoethyl cellulose (DE 52)	Whatman, Maidstone, England
Earle's Balanced Salt Solution (EBSS), 10 x	Gibco-BRL, Eggstein
Ethanol, vergällt, 70%	Merck, Darmstadt
Foetales Rinderserum (FBS)	Gibco-BRL, Eggstein
Gentamycin (10 mg/ml)	Seromed, Berlin
GIEMSA-Stammlösung	Merck, Darmstadt
Glucose	Serva, Heidelberg
Glutamin	Sigma, Deisenhofen
Glycerol	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol, absolut	Merck, Darmstadt
Liquimin [®] N 25000IE	Hoffmann-LaRoche, Grenzbach-Whyhlen
MgSO ₄ x 7H ₂ O	Merck, Darmstadt
MEM (EAGLE)	Gibco-BRL, Eggstein

MEM non essential amino acid (100 x)	Gibco-BRL, Eggstein
2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
NaCl	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin- N-2-Ethansulfonsäure), Na-Salz	Sigma, Deisenhofen
Natriumpyruvat	Serva, Heidelberg
Ortho-Phosphorsäure	Merck, Darmstadt
Phenolrot	Merck, Darmstadt
Tris (hydroxymethyl) aminomethan	Serva, Heidelberg

7.1.5 Verbrauchsmaterialien

Cryoröhrchen, 1 ml	Merck, Darmstadt
Deckgläschen (18x18 mm)	Menzel-Gläser
Einmal-Filterhalter FP 030/3 (0,2 µm)	Schleicher & Schuell, Dassel
Einmal-Filterhalter FP 030/2 (0,45 µm)	Schleicher & Schuell, Dassel
Einmal-Kanülen (1,5 x 1000 mm)	TSK-Supra, Geislingen
Einmal-Kanülen (1,1 x 30 mm)	Braun, Melsungen
Einmal-Kanülen (0,6 x 30 mm)	Braun, Melsungen
Einmal-Kanülen (0,4 x 12 mm)	Braun, Melsungen
Einmal-Pipetten (10 ml)	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Einmal-Spritzen, luer (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)	Braun, Melsungen
Hämatokrit-Kapillaren (75 mm/ 60 µl)	Merck, Darmstadt
Hämatokrit-Versiegelungskitt	Merck, Darmstadt

Mikrotiterplatten (96-Lochplatten)	Nunc GmbH, Wiesbaden-Bieberich
Multiwellplatten (24-Lochplatten)	Nunc GmbH, Wiesbaden-Bieberich
Objektträger (76x26 mm)	Menzel-Gläser
Pipettenspitzen (100 µl, 1000 µl)	Eppendorf-Nethler-Hinz GmbH, Hamburg
Pur-Zellin, 4x5 cm	Hartmann, Heidenheim
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf-Nethler-Hinz GmbH, Hamburg
Sterilfilter (Bottle Top Filter, 0,2 µm)	Costar Corning, Tübingen
Zentrifugenröhrchen (4 ml, 15 ml)	Costar Corning, Tübingen

7.1.6 Geräte

Brutschrank	Heraeus, Hanau
Einfrierbox, Nalgene [®]	Nalgene Company, Rochester
Heizblock, Modell 3401	Eppendorf-Nethler-Hinz GmbH, Hamburg
Hämofuge A, Hämatokritzentrifuge, (Modell 2010)	Hettich, Tuttlingen
Heizwasserbad	Köttermann
Kühlzentrifuge, Rotenta R	Hettich, Tuttlingen
Magnetheizrührer, Ikamag Ret	Janke & Kunkel GmbH, Staufen
NEUBAUER-Zählkammer (Tiefe 0,1 mm; 0,0025 mm ²)	Assistent, Berlin
Oberschalenwaage	Sartorius GmbH, Göttingen
Objektive:A 10/0.25 160/- bzw. SPL 20/0.25	Hund, Wetzlar
Objektive:F 40/0.65 bzw. Ph3 40/0.5 Öl	Zeiss, Jena
pH-Meter, Calimatic, Modell 761	Knick, Berlin
Pipetboy Acu, Pipettierhilfe	Integra Biosciences
Pipettierhilfen, Varipetten (100 µl,1000 µl)	Eppendorf-Nethler-Hinz GmbH, Hamburg
Tiefkühltruhe, Queue [®]	Nunc GmbH, Wiesbaden-Bieberach

Tischzentrifuge, Modell 5415C

Eppendorf-Nethler-Hinz GmbH, Hamburg

Umkehrmikroskop für Zellkulturen, Wilovert®

Hund, Wetzlar

Vortex, Modell VF2

Janke & Kunkel GmbH, Staufen

7.2 Verwendete Begriffe und ihre Definitionen (WHO, 1999)

Trypanosomenspezies:

Gruppe von Organismen, die sich von anderen Arten durch ein oder mehrere spezifische morphologische und genetische Merkmale unterscheiden.

Trypanosomensubspezies:

Gruppe von Organismen innerhalb einer Art, die sich nicht morphologisch aber durch andere genetische Merkmale von einander unterscheiden.

Trypanosomenklone:

Trypanosomen, die durch Vermehrung aus einem einzigen Trypanosomenindividuum entstanden sind.

Trypanosomenpopulation:

Gruppe von Trypanosomen, die zu einer bestimmten Zeit in einem bestimmten Wirt oder in einer Kultur vorhanden sind.

Primärisolat:

Lebensfähige Trypanosomen

in einer *in-vitro*-Kultur oder in einem Versuchstier, die direkt aus der Probe eines natürlich infizierten Wirts hervorgegangen sind.

in Form eines Stabilats aus einer Probe des natürlich infizierten Wirts.

Probe:

Teil einer Trypanosomenpopulation, die zu einer bestimmten Zeit (aus einem Wirt/einer Kultur) entnommen wird.

Stabilat:

Tiefgefrorene Probe von lebensfähigen Trypanosomen.

Trypanosomenstamm:

Trypanosomenpopulation, entstanden nach *in-vivo*- oder *in-vitro*-Passagen eines Primärisolats, ohne weitere Berücksichtigung der Homogenität (Gleichartigkeit) oder anderer Merkmale.