

At Serumunun Farklı Konsantrasyonlarının *Trichomonas vaginalis* Kriyoprezervasyonuna Etkisi[§]

The Effects of Different Concentrations of Horse Serum on *Trichomonas vaginalis* Cryopreservation

Vildan Turan Faraşat*[✉], İbrahim Çavuş*[✉], Ahmet Özbilgin*[✉]

* Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye

Atf/Cite as: Turan Faraşat V, Çavuş İ, Özbilgin A. At serumunun farklı konsantrasyonlarının *Trichomonas vaginalis* kriyoprezervasyonuna etkisi. Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2022;52(2):103-108.

Öz

Amaç: *Trichomonas vaginalis* kamçı ve aksostil gibi yapıları olan tek hücreli bir protozoondur ve yalnızca insanı enfekte eder. Oluşturduğu hastalık tablosu "trichomoniasis" olarak isimlendirilen bu parazit, tüm dünyada cinsel yolla bulaşan etkenler arasında üst sıralarda yer almaktadır. Tanısal amaçla kültür yöntemleri kullanılmaya devam edilse de mikroorganizmayı sürekli alt kültürler ile saklamak yerine kriyoprezervasyon yöntemlerini kullanmak parazitin özelliklerini güvenle ve uzun süre korumasına yardımcı olur. Bu çalışmada, *Trichomonas vaginalis* kriyoprezervasyonunda çeşitli oranlarda at serumu kullanmanın canlılık üzerine etkisini saptamayı amaçladık.

Yöntem: Çalışmamızda, ATCC 30188 kodlu *Trichomonas vaginalis* izolatının TYM besiyerine ekimleri yapılmıştır. Kriyoprezervasyon işleminde belirli miktar besiyerine %20, %50, %70 ve %90 oranlarında at serumu + DMSO eklenmiş, steril kriyotüplerin içerisine 1 ml aktararak dondurulmuştur. Çalışma zamanı izolat canlandırılmış, sonraki günlerde üremesi kontrol edilmiştir.

Bulgular: Kriyoprezervasyon işleminde *Trichomonas vaginalis* izolatlarında at serumunun artan oranlarda kullanımının canlılığa katkıda bulunduğu görülmüştür. Yüzde 20, %50, %70 ve %90 oranında at serumu ile kriyoprezervasyonu yapılmış izolatların canlılıkları sırasıyla %50, %60, %70 ve %75 olarak bulunmuştur. İzolatın takip eden günlerde benzer şekilde yüksek oranlarda üremeye devam ettiği fark edilmiştir.

Sonuç: *Trichomonas vaginalis*'in kriyoprezervasyon işleminde at serumunun artan oranlarda kullanılması olumlu bir etkiye sahiptir. Kriyoprezervasyon protokolleri oluşturulurken, hem hücrelerin ve mikroorganizmaların birbirinden farklı biyolojik özellikleri göz önünde bulundurulmalı hem de kullanılan biyokimyasal içeriğin uygun oranları hesaplanmalıdır.

Anahtar kelimeler: *Trichomonas vaginalis*, at serumu, kriyoprezervasyon

ABSTRACT

Objective: *Trichomonas vaginalis* is a single-celled protozoan with structures such as flagella and axostyle, and it infects only the humans. This parasite, the causative agent of trichomoniasis, ranks high among sexually transmitted agents all over the world. Although culture methods continue to be used for diagnostic purposes, using cryopreservation methods instead of keeping the microorganism with continuous subcultures helps maintenance of the safe for a long time. In this study, we aimed to determine the effects of using horse serum at various rates on the viability of *Trichomonas vaginalis* trophozoites during cryopreservation.

Methods: In our study, the isolate of *Trichomonas vaginalis* encoded as ATCC 30188 was cultivated in TYM media. For cryopreservation, 20%, 50%, 70%, and 90% of horse serum + DMSO were added to a certain amount of medium and 1 ml of the mixture was transferred into sterile cryotubes and frozen. It was thawed at the time of the study and checked for growth in the following days.

Results: It has been observed that increasing rates of horse serum in *Trichomonas vaginalis* isolates contributes to viability in cryopreservation. The viability of the isolates cryopreserved with 20%, 50%, 70% and 90% of horse serum were found to be 50%, 60%, 70% and 75%, respectively. The isolate continued to grow at similar high rates in the following days, as well.

Conclusion: The use of increasing concentrations of horse serum has a positive effect in the cryopreservation of *Trichomonas vaginalis*. Unique biological properties of cells and microorganisms should be taken into account while creating cryopreservation protocols, and the most appropriate rates of all biochemical content should be calculated.

Keywords: *Trichomonas vaginalis*, horse serum, cryopreservation

Alındığı tarih / Received:
31.05.2021 / 31.May.2021

Kabul tarihi / Accepted:
27.07.2021 / 27.July.2021

Erken çevrimiçi / First Published:
10.06.2022 / 10.June.2022

ORCID Kayıtları

V. Turan Faraşat 0000-0002-8464-4502
İ. Çavuş 0000-0002-3860-0146
A. Özbilgin 0000-0003-3613-8741

✉ vildanturan45@gmail.com

[§]Bu çalışmanın bir kısmı, Uluslararası 21. Parazitoloji Kongresi'nde (28 Eylül-03 Ekim 2019, Çeşme, İzmir) poster olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Trichomonas vaginalis tek hücreli, kamçılı, mikroaerofilik vajinit etkeni bir protozondur. Bu protozoonun oluşturduğu hastalık olan trichomoniasis cinsel yolla bulaşan nonviral etkenler arasında ilk sırayı almaktadır. 2016 yılı için tüm dünyada 156 milyon yeni olgunun olduğu düşünülmektedir⁽¹⁾. Trichomoniasis, önemli bir iş günü kaybı nedenidir⁽²⁾. Türkiye’de prevalans, çalışmaların yapıldığı topluluğun sosyoekonomik özelliklerine, yıllar ve kullanılan tekniklere göre değişmektedir. Yereli ve ark.⁽³⁾ 1997 yılında prevalansı %13.1, Östan ve ark.⁽⁴⁾ 2005 yılında %4.7, Doğan ve ark.⁽⁵⁾ 2019 yılında %6.7-%8.6 arasında bulmuşlardır.

Trichomoniasis, kadınlarda yaklaşık %50 oranında asemptomatik olsa da görülen semptomlar hafiften şiddetliye doğru değişmektedir. Sıklıkla akıntı, kızarıklık, kaşıntı, yanma ve ağrılı cinsel ilişki gibi vajinit semptomları görülen bu hastalık uygun tedavi edilmediğinde servisit, uretrit, pelvik inflamatuvar hastalık, infertilite, servikal kanser ile de ilişkilidir⁽⁶⁻⁸⁾. Gebelik süresinde trichomoniasis enfeksiyonu, preterm doğum ve düşük doğum ağırlıklı bebek ile ilişkilidir⁽⁹⁾. Erkeklerde *T. vaginalis* enfeksiyonu genellikle asemptomatik olsa da dizüri ve akıntı ile seyreden uretrit tabloları, ateş, sık ve ani idrara çıkma isteği ve genital bölgede ağrı ile seyreden prostatit tabloları görülebilir⁽¹⁰⁾.

Hareketli parazitleri görebileceğimiz vajinal veya servikal örneklerden direkt mikroskopi yöntemi, tanıda ilk tercih edilebilecek yöntemdir. Direkt mikroskopi tüm diğer metotlara göre kolay, hızlı, ucuz ve en az tecrübe isteyen metottur. Günümüzde moleküler yöntemler de tanı için kullanılmaktadır, ancak bu mikroorganizma için hâlen kültürün altın standart olduğu kabul edilmektedir⁽¹¹⁾. Tanı amacıyla parazitleri üretebilmek için sıvı ve katı olmak üzere çeşitli besiyerleri kullanılmaktadır. Sıklıkla TYM (Trypticase-Yeast Extract-Maltose), CPLM (Sistein-Pepton-Karaciğer-Maltoz) gibi at serumu içeren besiyerinde üretilip, çoğaltılmakta ve sürekli pasajlar ile saklanmaktadır⁽¹²⁾.

Mikroorganizmayı sürekli pasajlar ile saklamak çok maliyetlidir, hem iş gücü kaybına neden olmaktadır hem de parazitin çeşitli orijinal biyolojik ve metabolik özelliklerinin kaybı ile sonuçlanabilmektedir. Laboratuvarda uygulanan tanı testleri ve araştırmalar için canlı parazitlere gereksinim duyulmaktadır. Parazitlerin kültür ortamlarının yenilenmesi sırasında yapılabilecek hatalar, parazitin ölmesine ve araştırma sırasında geri dönüşsüz kayıplara neden olur. Parazit suşlarının besiyerlerinde sürdürülmesinin zor, pahalı ve zaman alıcı olması gibi nedenlerle yapılan kriyoprezervasyon işlemi, canlı hücre ve dokuların korunması için çok düşük sıcaklıkların kullanılmasıdır. Kriyoprezervasyon ile parazit, ilk günkü gibi virülansı korunmuş hâliyle saklanabilmektedir. *Plasmodium* spp, *Leishmania* spp, *Toxocara canis* gibi kan parazitlerinin hatta nematod larvalarının kriyoprezervasyon protokolleri ile saklandığı bilinmektedir⁽¹²⁻¹⁷⁾.

Kriyoprezervasyon yöntemini kullanılması, aşı, ilaç ve etken madde taramaları gibi çalışmaların sağlıklı sonuçlanması için parazitin güvenli ve uzun süre, özelliklerini kaybetmemesini sağlar⁽¹⁷⁾.

Farklı mikroorganizmaların üretiminde kullanılan besiyerlerinde kullanılan at serumunun olumlu etkileri bilinmektedir, aynı zamanda bakteri kriyoprezervasyonunda etkisini araştıran çalışmalar da olmuştur⁽¹⁸⁻¹⁹⁾. Türkiye’de de *T. vaginalis* üretiminde besiyerlerinde at serumu kullanılmıştır⁽²⁰⁾. *T. vaginalis* in vitro besiyerlerindeki üretiminde at serumu tercih edilmektedir, ancak kriyoprezervasyonunda ne düzeyde etkili olabileceği yeterince bilinmemektedir. Bu nedenle biz de çalışmamızda, *T. vaginalis* kriyoprezervasyonunda at serumunun canlılık üzerine etkisini saptamayı amaçladık.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda, Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi Parazit Bankası’nda bulunan ATCC 30188 kodlu *Trichomonas vaginalis* izolatu kullanıldı. Sıvı azot tankında korunan izolat çıkarılarak 37°C’lik su banyosunda çözdürüldü daha sonra TYM besiyerlerine ekimleri yapıldı.

TYM besiyeri hazırlama: Trypticase, yeast extract, maltose, L-cysteine HCl, L-ascorbic acid, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , distile su içerisinde karıştırıldıktan sonra agar eklendi ve çözünmesi sağlandı. Hazırlanan besiyeri otoklavlandı. Otoklavdan çıktıktan sonra 45°C'ye kadar soğuması beklendi ve 100 ml steril 56°C'de 30 dk'da inaktive edilmiş at serumu eklendi. Vida kapaklı tüplere dağıtıldı. Penicilin G, streptomycin, amphotericin B karışımı antibiyotik eklendikten sonra TYM besiyeri olarak kullanıldı.

Sıvı azot tankından çıkarılarak TYM besiyerine ekimi yapılan ATCC 30188 kodlu *T. vaginalis* izolatı 37°C'de inkübe edildi. Gün aşırı üreme durumu kontrol edildi. Üçüncü gün sonunda TYM besiyerinde bol miktarda üreyen izolat çalışmamızda kullanılmıştır.

Kriyoprezervasyon işleminden önce TYM besiyerinde üreyen izolatın canlılık durumu trypan blue boyası ile Thoma lamında sayılarak kontrol edildi. Çalışmaya başlamadan önce *T. vaginalis* izolatı 10^4 parazit/ml olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra 3 ml parazit içeren besiyeri içerisine son konsantrasyonu %15 olacak şekilde farklı oranlarda DMSO+at serumu eklendi ve homojen bir şekilde karıştırıldı (Tablo 1). Karıştırıldıktan sonra steril kriyo tüplerin içerisine 1

ml olacak şekilde aktarıldı. Kriyo tüpleri "cool cell" kutularına konarak -86°C'lik derin dondurucuya aktarıldı ve burada bir gece bekletildi. Ertesi gün "cool cell" kutuları içerisindeki kriyo tüpleri sıvı azot tanklarına aktararak kriyoprezervasyon işlemi tamamlandı^(21,22).

Sıvı azot tankına aktarılan örnekler altı ay sonra çıkarılarak 37°C'lik su banyosunda çözdürüldü ve canlılık kontrolleri trypan blue boyası ile Thoma lamında sayılarak yapıldı. Canlılık kontrolleri yapılan izolatlar TYM besiyerine ekimleri yapılarak 37°C'lik etüve kaldırıldı. Örneklerin canlılık durumları gün aşırı trypan blue boyası ile Thoma lamında sayılarak incelendi.

BULGULAR

Yaptığımız çalışma sonucunda günlere göre *T. vaginalis* kültürünün üreme yoğunlukları Tablo 2'de verilmiştir. Kriyoprotektana ilave edilen sırasıyla %20, %50, %70 ve %90 at serumu ile %50, %60, %70 ve %75 kriyoprezervasyon sonrası canlılık saptanmıştır (Tablo 2). Takip eden günlerde canlandırma günündeki oranlara paralel şekilde *T. vaginalis* üremeleri görülmüştür.

Tablo 1. Kriyoprezervasyon aşamasında Kriyoprotektana ilave edilen at serumu yüzdeleri

At Serumu Oranı (%)	At Serumu Miktarı (µl)	Kriyoprotektan* Miktarı (µl)	TYM** Besiyeri Miktarı (µl)	Toplam Besiyeri Miktarı (µl)
%20	90	360	2550	3000
%50	225	225	2550	3000
%70	315	135	2550	3000
%90	405	45	2550	3000

*DMSO: Dimetilsülfoksit; **TYM: Trypticase, Yeast Extract, Maltose

Tablo 2. Kriyoprezervasyon sonrası *Trichomonas vaginalis*'lerin üreme oranları

At Serumu Yüzdesi (%)	Kriyoprezervasyon Aşamasında*	Canlandırılma Günü	2. Gün*	3. Gün*
20	10^4	%50 canlı	3×10^5	3×10^6
50	10^4	%60 canlı	4×10^5	4×10^6
70	10^4	%70 canlı	4×10^5	4×10^6
90	10^4	%75 canlı	5×10^5	5×10^6

* Parazit/ml

TARTIŞMA

Trichomonas vaginalis, viral olmayan cinsel yolla bulaşan etkenler arasında sık saptanan patojenlerdendir⁽²³⁾. Parazitlerin uygun şekilde saklanabilmesi, kriyoprezervasyon yöntemleri ile olasıdır. Dondurma sırasında oluşan buz kristallerinin hücreleri parçalayabildiği, doğrudan mekanik etkilerle ya da sıvı fazın bileşimindeki değişikliklere bağlı olarak hücrelere zarar verdiği bilinmektedir. Bu nedenle kriyoprotektan adı verilen bileşikler kullanılmaktadır⁽¹²⁾. Ancak, hücreler yüksek doz kriyoprotektanlar ile karşılaştığında, ozmotik dehidratasyona uğrarlar. Bu nedenle kriyoprezervasyon protokolleri belirlenirken, hücrelerin birbirinden farklı biyolojik özellikleri göz önünde tutularak hesaplanmalıdır⁽¹²⁾. Pek çok parazitin en ideal kriyoprezervasyonu ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Çavuş ve ark.⁽¹⁷⁾ *Leishmania* türlerinde yaptıkları çalışmada, kriyoprezervasyon işlemi sonrasında %60-65 canlılık oranını elde etmişlerdir. Verma ve ark.⁽²⁴⁾ *Sarcocystis* türlerinde farklı yaşam döngülerinde başarılı oldukları kriyoprezervasyon protokollerini çalışmalarında paylaşmışlardır. Filardi ve ark.⁽²⁵⁾ *Trypanosoma cruzi* kriyoprezervasyon çalışmalarında suşların biyolojik özelliklerinin değişmediğini saptamışlardır. Laurimae ve ark.⁽²⁶⁾ ise 35 yıl önce kriyoprezerve ettikleri *Echinococcus multilocularis* protokolekslerinde %76 metasestodlarında %42 canlılık oranları saptamışlardır.

Trichomonas vaginalis'in in vitro kültürlerinde at serumunu değerlendiren çeşitli çalışmalar mevcuttur. Atambay ve ark.⁽²⁰⁾ yaptıkları çalışmada, insan, at ve koyun serumlarında üremeleri karşılaştırmışlardır. Benzer şekilde Dağcı ve ark.⁽²⁷⁾ yaptıkları çalışmada, insan, at ve fetal sığır serumu (Fetal Bovine Serum-FBS) kullanarak *T. vaginalis* üremesine olan etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmalara göre, at serumu olumlu katkı yapmakla beraber, suşa göre değişiklik gösterdiği saptanmıştır. Üstün ve ark.⁽²²⁾ gliserin ve dimetilsülfoksit ile *T. vaginalis* kriyoprezervasyonunu yaptıklarını bildirmişleridir. Matsuo⁽²⁸⁾ *T. vaginalis* kriyoprezervasyonunda çeşitli kriyoprotektan oranlarında ve yavaş soğutma-hızlı dondurma sonucunda canlılık oranlarını değerlendirmiştir. Yavaş

soğutma protokolü, hızlı dondurma protokolüne göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek canlılık oranlarına sahip bulunmuştur. Miyake ve ark.⁽²⁹⁾'nın kriyoprezervasyon çalışmasında, *T. vaginalis*, *Entamoeba histolytica*, *Leishmania amazonensis*, *Blastocystis hominis*, *Trypanosoma brucei gambiense*, *Pentatrichomonas hominis* protozoan parazitlerinin canlılığının korunmasına kriyoprotektan maddelerin ve ısı değişimlerinin etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada, gliserol, polivinilpirolidon, propanediol, yumurtasarı, at serumu ve DMSO ayrı kriyoprotektan maddeler olarak kullanılmıştır. Tüm bu çalışmaların sonucunda, at serumunun kriyoprotektan madde olarak değil kriyoprotektan maddeleri dengeleyici olarak kullanılması daha uygun gibi görünmektedir. At serumunun, *T. vaginalis*'i kaplayarak koruyucu olabileceği ve aynı zamanda at serumu kullanımının DMSO'nun daha seyreltik hâle gelip zehirli etkisinin hafiflemesini sağlayarak canlılığa katkısı olabileceğini düşünmekteyiz.

Sonuç olarak, at serumunun artan oranlarda kullanılması kriyoprezervasyon işleminin sonunda canlılığa ve parazitin çoğalmasına katkıda bulunmuştur. *T. vaginalis* kriyoprezervasyon işleminin optimizasyonu için çalışmaların devam edeceği düşünülmüştür.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

KAYNAKLAR

1. Rowley J, Vander Hoorn S, Korenromp E, et al. Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: Global prevalence and incidence estimates, 2016. Bull World Health Organ. 2019;97(8):548-62. <https://doi.org/10.2471/BLT.18.228486>
2. Vos T, Allen C, Arora M, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. Lancet. 2016;388(10053):1545-602. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31678-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31678-6)

3. Yereli K, Balcioglu IC, Degerli K, Ozbilgin A, Daldal N. Incidence of *Trichomonas vaginalis* among women having vaginal discharge, in Manisa, Turkey. *J Egypt Soc Parasitol.* 1997;27(3):905-11. PMID: 9425833.
4. Östan I, Sözen U, Limoncu ME, Kilimcioğlu AA. Manisa'da vajinal akıntılı kadınlarda *Trichomonas vaginalis* sıklığı. *Türkiye Parazitoloj Derg.* 2005;29(1):7-9. PMID: 17167734.
5. Dogan N, Gitmez F. Eskişehirde kadın doğum kliniklerine başvuran kadınlarda *Trichomonas vaginalis* görülme sıklığının farklı yöntemlerle araştırılması ve çeşitli sosyal değişkenlerle olan ilişkisinin değerlendirilmesi. *Osmangazi J Med.* 2019;41(1):46-57. <https://doi.org/10.20515/otd.425776>
6. Petrin D, Delgaty K, Bhatt RGG. Clinical and microbiological aspects of vaginitis. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(2):300-17. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.2.300>
7. Zhang Z, Begg CB. Is *Trichomonas vaginalis* a cause of cervical neoplasia? Results from a combined analysis of 24 studies. *Int J Epidemiol.* 1994;23(4): 682-90. <https://doi.org/10.1093/ije/23.4.682>
8. Grodstein F, Goldman MB, Cramer DW. Relation of tubal infertility to history of sexually transmitted diseases. *Am J Epidemiol.* 1993;137(5):577-84. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a116711>
9. Cotch MF, Pastorek JG, Nugent RP, et al. *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. *Sex Transm Dis.* 1997;24(6):353-60. <https://doi.org/10.1097/00007435-199707000-00008>
10. Krieger JN, Jenny C, Verdon M, et al. Clinical manifestations of trichomoniasis in men. *Ann Intern Med.* 1993;118(11):844-9. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-118-11-199306010-00003>
11. Bachmann LH, Hobbs M, Sena A, et al. *Trichomonas vaginalis* genital infections: Progress and challenges. *Clin Infect Dis.* 2011;53(Suppl 3):S160-72. <https://doi.org/10.1093/cid/cir705>
12. Korkmaz M, Ok ÜZ. Parazitolojide Laboratuvar. Yayın No: 23. İzmir, Türkiye: Türkiye Parazitoloji Derneği, 2011: 405-7.
13. Mutetwa SM, James ER. Cryopreservation of *Plasmodium chabaudi*. II. Cooling and warming rates. *Cryobiology.* 1984;21(5):552-8. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(84\)90054-3](https://doi.org/10.1016/0011-2240(84)90054-3)
14. Ramp T, Eckert J, Gottstein B. Cryopreservation and long-term in vitro maintenance of second-stage larvae of *Toxocara canis*. *Parasitol Res.* 1987;73(2):165-70. <https://doi.org/10.1007/BF00536474>
15. Hobbs MM, Seña AC. Modern diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection. *Sex Transm Infect.* 2013;89(6):434-8. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2013-051057>
16. Gill JH, Redwin JM. Cryopreservation of the first-stage larvae of trichostrongylid nematode parasites. *Int J Parasitol.* 1995;25(12):1421-6. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(95\)00074-7](https://doi.org/10.1016/0020-7519(95)00074-7)
17. Çavuş İ, Ocak F, Kaya T, Özbilgin A. Manisa ilimizde görülen leishmaniasis etkeni *Leishmania türlerinin* kriyoprezervasyonu. *Türkiye Parazitoloj Derg.* 2017. 2017; 41(3):152-5. <https://doi.org/10.5152/tpd.2017.5267>
18. Ramos MI, Hermosura ME, Nakabayashi T. Cultivation of *Plasmodium falciparum* using animal serum (Horse, calf and bovine) as human serum substitute. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A.* 1986;262(4):551-8. [https://doi.org/10.1016/s0176-6724\(86\)80149-3](https://doi.org/10.1016/s0176-6724(86)80149-3)
19. Shahamat M, Paszko-Kolva C, Mai UEH, Yamamoto H, Colwell RR. Selected cryopreservatives for long term storage of *Helicobacter pylori* at low temperatures. *J Clin Pathol.* 1992;45(8):735-6. <https://doi.org/10.1136/jcp.45.8.735>
20. Atambay M, Karaman, Ü, Aycan ÖM, Daldal N. Farklı serumların *Trichomonas vaginalis*'in CPLM besiyerinde üreme süresine ve yoğunluğuna etkisi. *Türkiye Parazitoloj Derg.* 2002;26(4):374-6.
21. Üner A, Özbek Y. Cryopreservation prensipleri ve parazitolojideki uygulamaları. *Türkiye Parazitoloj Derg.* 1990;14(2):91-110.
22. Üstün Ş, Taşcı S, Dağcı H, et al. *Trichomonas vaginalis*'in gliserin ve dimetilsülfoksit ile kriyoprezervasyonu. *Türkiye Parazitoloj Derg.* 1994;18(4):431-3.
23. Schumann JA, Plasner S. Trichomoniasis. [Updated 2021]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534826> (Erişim tarihi: Ekim 2021).
24. Verma SK, Lindsay DS, Grigg ME, Dubey JP. Isolation, culture and cryopreservation of *Sarcocystis* species. *Curr Protoc Microbiol.* 2017;45:20D.1.1-27. <https://doi.org/10.1002/cpmc.32>
25. Filardi LS, Brener Z. Cryopreservation of *Trypanosoma cruzi* bloodstream forms. *J Protozool.* 1975;22(3):398-401. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1975.tb05190.x>
26. Laurimäe T, Kronenberg PA, Alvarez Rojas CA, Ramp TW, Eckert J, Deplazes P. Long-term (35 years) cryopreservation of *Echinococcus multilocularis* metacystodes. *Parasitology.* 2020;147(9):1048-54. <https://doi.org/10.1017/S003118202000075X>

27. Dağcı H, Üstün Ő, Akısu Ç, Aksoy Ü. The effect of human, horse and fetal bovine sera on the growth of *Trichomonas vaginalis*. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakóltesi Dergisi. 2003;17(2):101-5.
28. Matsuo J. A simple and rapid method for cryopreservation of *Trichomonas vaginalis*. Parasitol Res. 2007;101(4):907-11.
<https://doi.org/10.1007/s00436-007-0559-y>
29. Miyake Y, Karanis P, Uga S. Cryopreservation of protozoan parasites. Cryobiology. 2004;48(1):1-7.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2003.10.004>