مقاله پژوهشی

شناسایی و تعیین فراوانی گونه های کاندیدا جدا شده از بیماران به روش کروم آگار کاندیدا

دکتر سیدحسین میرهندی * ، دکتر کوایچی ماکی مورا ** ، دکتر محمدرضا شیدفر * ، لیلا حسین پور ***

دریافت : ۸۴/۱۱/۱۶ ، پذیرش : ۸۵/۸/۱

چکیده:

مقدمه و هدف : گونه‌های قارچ مخمری جنس کاندیدا می‌توانند دامنه وسیعی از عفونت‌های فرصت‌طلب را در انسان و حیوان ایجاد نمایند. کاندیدا آلبیکنس گونه اصلی بیماری‌زا است ولی سایر گونه‌ها مثل کاندیدا گلابراتا، کاندیدا کروزه‌ای و کاندیدا تروپیکالیس نیز گاهی عوامل بیماری بوده و از بیماران جدا می‌شوند. شناسائی کاندیداها در سطح گونه برای درمان مؤثر بیماری و کنترل عفونت ضروری است. هدف این مطالعه ارزیابی محیط کشت جدید کروم آگار کاندیدا (CHROMagar Candida) جهت افتراق مخمرهای جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت کاندیدایی،بوده است.

روش کار : شانزده استرین مخمری استاندارد، از گونه‌های کاندیدا و غیر کاندیدا به عنوان رفرانس تشخیص صحیح گونه‌های مربوط به بیماران مورد استفاده قرار گرفت. تعداد ۲۸۰ ایزوله مخمری جدا شده از بیماران مراجعه‌کننده به دو آزمایشگاه قارچ‌شناسی در تهران نیز به عنوان جامعه مورد مطالعه بررسی گردید. کلیه مخمرهاروی محیط « کروم آگار کاندیدا» به روش خطی کشت داده شده و به مدت ٤٨ ساعت در حرارت $35^{\circ}C$ نگهداری شد و آنگاه با توجه به رنگ اختصاصی ایجاد شده در محیط کشت اقدام به شناسائی گونه‌ها گردید. در مورد کلنی‌های فاقد رنگ اختصاصی برای تشخیص گونه ها از روش PCR-RFLP استفاده شد.

نتایج : بیشترین فراوانی مربوط به کاندیدا آلبیکنس (۶۶/۵٪)، و بعد از آن به ترتیب کاندیدا پاراپسیلوزیس (۸/۶٪)، کاندیدا تروپیکالیس (۸/۲٪)، کاندیدا گلابراتا (۶/۱٪)، کاندیدا کروزه‌ای (٤/۶٪)،کاندیدا کفیر (۲/۵٪)، کاندیدا گیلیرموندی (۰/۷٪)، کاندیدا لوزیتانیا (۰/۳۵٪) و کریپتوکوکوس نئوفورمنس (۰/۳۵٪) بود.

نتیجه نهائی : محیط کشت کروموژنیک کروم آگار کاندیدا می‌تواند روشی ساده و سر راست برای شناسائی گونه‌های شایع کاندیدا شامل کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا کروزه‌ای، کاندیدا گلابراتا و کاندیدا تروپیکالیس باشد، اما همه ایزوله های بیماران را نمی‌توان با این روش باز شناخت و لذا روش‌های فنوتیپیک یا ژنوتیپیک دیگر برای افتراق آنها ضروری است.

کلید واژه ها : شناسایی / کاندیدا / کروم آگار

مقدمه :

کاندیدیازیس نه یک بیماری، بلکه طیفی از بیماری‌ها است که به صورت فرصت‌طلب در افراد دچار زمینه، عفونت های مختلف و متنوعی را ایجاد می‌کند. گستره این بیماری‌ها از عفونت‌های سطحی و مخاطی ساده تا عفونت‌های سیستمیک خطرناک و حتی عفونت‌های منتشره کشنده، کشیده شده است. عوامل علیتی بیماری، قارچ‌های مخمری متعلق به جنس کاندیدا می‌باشند.

اگرچه کاندیدا آلبیکنس(*Candida albicans*) شایع‌ترین عامل کاندیدایی مسئول عفونت در اشکال

* استادیار گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران(mirhendi@tums.ac.ir)

** استاد انستیتو قارچ شناسی دانشگاه تیکیو (Teikyo) ژاپن

*** کارشناس آزمایشگاه قارچ شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران

بالینی مختلف کاندیدیازیس بوده و هست، ولی گونه‌های دیگر متعلق به جنس کاندیدا از جمله کاندیدا تروپیکالیس (*C. tropicalis*)، کاندیدا گلابراتا (*C. glabrata*)، کاندیدا کروزه‌ای (*C. krusei*)، کاندیدا پاراپسیلوزیس (*C. parapsilosis*) ، کاندیدا گیلیرمondی (*C. guilliermondii*) و غیره نیز کم و بیش از بیماران جدا می‌شوند. اهمیت گونه‌های غیر آلبیکنس در سال‌های اخیر به واسطه بروز مقاومت نسبی در بعضی از این گونه‌ها نظیر کاندیدا تروپیکالیس و کاندیدا گلابراتا نسبت به برخی از داروهای ضد قارچی زیادتر شده است (۳-۱). این موضوع باعث افزایش وفور نسبی این گونه‌ها می‌گردد، ضمن این که تعیین فراوانی گونه‌های مسئول عفونت‌ها از نقطه نظر اپیدمیولوژیک و کنترل عفونت‌ها به خصوص در عفونت‌های بیمارستانی ناشی از کاندیداها حائز اهمیت است.

رویکردهای متنوعی برای شناسائی کاندیدا آلبیکنس و سایر گونه‌های کاندیدا وجود دارد. رویکردهای قدیمی‌تر که البته هنوز هم معتبرند، بیشتر مبتنی بر ویژگی‌های فنوتیپیک نظیر مرفولوژی، بیوشیمی و فیزیولوژی مخمرها (الگوهای جذب و تخمیر قندها) و روش‌های جدیدتر بیشتر بر اساس خصوصیات ژنوتیپیک مثل اختلاف ترادف قطعات خاصی از DNA مربوط به هر مخمر می‌باشد (۶-۴). با این وجود هنوز هم روش‌های فنوتیپیک جدیدی در حال توسعه است.

از جمله محیط‌های کشت جدید برای افتراق کاندیداهای شایع ، محیط کشت کروموژنیک موسوم به کروم آگار کاندیدا است. این محیط که در سال ۱۹۹۴ معرفی گردید (۷)، حاوی پپتون (۱۰گرم)، گلوکز (۲۰ گرم)، آگار (۱۵ گرم)، کلرآمفنیکل (۰/۵ گرم) و گروهی از مواد رنگ‌زا (Choromogenic mix) به میزان ۲ گرم در هر لیتر است. خصوصیت ویژه این محیط کشت این است که کلنی هر کدام از گونه‌های شایع کاندیدا پس از رشد روی این محیط، به رنگ خاصی است که با سایر گونه‌ها اشتباه نمی‌شود.

در مطالعه حاضر مخمرهای جدا شده از بیماران با محیط کشت مزبور مورد شناسائی قرار گرفته‌اند. همچنین گونه‌های مخمری استاندارد حائز اهمیت در پزشکی روی محیط کروم آگار کاندیدا کشت داده شده و رنگ آنها مورد مقایسه قرار گرفته است.

روش کار:

این پژوهش به صورت یک مطالعه توصیفی مقطعی برای شناسائی عوامل علیتی عفونت‌های ناشی از مخمرها در بیماران، با استفاده از کشت روی محیط افتراقی کروم آگار کاندیدا انجام شده است.

نمونه‌ها: ۱۶ نمونه مخمر استاندارد تهیه شده از کلکسیون‌های بین‌المللی مورداستفاده قرار گرفت(جدول ۱).

جدول ۱: استرین های مخمری استاندارد تهیه شده از کلکسیون‌های بین‌المللی، مورد استفاده در این مطالعه

ردیف	قارچ	منبع تهیهٔ قارچ	شمارهٔ استرین
۱	کاندیدا آلبیکنس	ATCC*	۱۰۲۶۱، ۱۰۲۳۱، ۲۴۴۳۲
۲	کاندیدا گلابراتا	ATCC, CBS**	۱۳۸، ۹۰۰۳۰
۳	کاندیدا تروپیکالیس	ATCC, TIMM***	۳۱۳، ۰۷۵۰
۴	کاندیدا کروزه‌ای	ATCC , TIMM	۳۴۰۴، ۶۲۵۸
۵	کاندیدا پاراپسیلوزیس	ATCC	۲۲۰۱۹، ۹۰۰۱۸
۶	کاندیدا دابلینینسیس	CBS	۲۷۴۷
۷	کریپتوکوکوس نئوفورمنس	ATCC	۹۰۱۱۳
۸	ساکارومیسس سرویسیه	ATCC	۲۳۶۶، ۹۷۶۳
۹	ترایکوسپورون آساهی	TIMM	۳۱۴۰

* American Type Culture Collection
** Centraalbureau voor Schimmelcultures, Netherlands
*** Teikyo University Institute of Medical Mycology, Japan

همچنین تعداد ۲۸۰ ایزوله مخمری از بیماران مبتلا به عفونت‌های جلدی، مخاطی و عمیق که طی حدود یک سال به آزمایشگاه‌های قارچ‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران و یک آزمایشگاه خصوصی درتهران مراجعه کرده بودند، جدا گردید. نمونه‌های بالینی شامل پوسته، ترشحات مخاطی، ناخن، ادرار، خلط، نمونه‌های بافتی مختلف و غیره بود.

جداسازی مخمرها: نمونه‌های بالینی روی محیط سابورو دکستروز آگار (گلوکز ۴٪، پپتون ۱٪، آگار ۱/۵٪) کشت داده شد و پس از رشد کلنی‌های مخمری، با استفاده از لوپ استریل، برداشت شده و به لوله‌های اپندرف حاوی آب مقطر استریل منتقل و تا موقع لازم در فریزر ۲۰- نگهداری گردید.

کشت روی محیط کروم آگار کاندیدا: تمام مخمرها اعم از مخمرهای استاندارد شناسنامه‌دار و مخمرهای جدا شده از بیماران روی پلیتهای به قطر ۹ سانتیمتر حاوی cc ۲۰ محیط کروم آگار(CHROMagar company, Paris, France) به روش خطی کشت داده شد. پلیت‌ها در حرارت ۳۵ درجه

سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری و پس از آن اقدام به بررسی ماکروسکوپی آنها گردید. ایزوله‌های بالینی با مقایسه رنگ کلنی‌های متعلق به استرین‌های استاندارد و با توجه به رنگ‌های معرفی شده در کاتالوگ شرکت سازنده شناسائی گردید.

شناسائی سایر مخمرها: کلیه ایزوله‌ها از جملـه مخمرهـایی که رنگ کلنی آنها در محیط کروم آگار برای شناسایی آنها اختـصاصی نبـود، بـا اسـتفاده از روش PCR-RFLP (۸) (و در صورت لزوم سـایر روش‌هـا) شناسـائی گردیـد. ایـن روش براساس تقویت قطعه ITS1-5.8S-ITS2 در DNAی ریبـوزومی بـه روش PCR و بـا اسـتفاده از پرایمرهـای یونیورسال ITS1، ITS4 و آن گاه برش محصولات تقویـت شده با PCR توسط آنزیم محدود الاثر *Hpa*II می‌باشد. بـا توجه به پلیمرفیسم ناشی از مختلف بودن محل‌های بـرش آنزیم‌ها در محصولات PCR و بالتبع مختلف بـودن انـدازه حاصل از برش، اقـدام بـه شناسـائی مخمرهـا شـد. انـدازه قطعات DNA پس از الکتروفورز آنها روی ژل آگـارز ۱/۸٪ مشخص گردید.

نتایج :

تمام ایزوله‌های مخمری قادر به رشد بر روی محیط کروم آگار بوده، با توجه به تفاوت رنگ حاصله و مقایسه با رنگ کلنی‌های مربوط به سویه‌های استاندارد اقدام به شناسایی آنها شد. تفاوت رنگ‌ها در کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا تروپیکالیس و کاندیدا کروزه‌ای کاملاً متمایز بود به نحوی که می‌توان این سه قارچ را در اولین نگاه و با توجه به رنگ اختصاصی تولید شده بازشناخت. کاندیدا گلابراتا نیز تا حدودی مشخص بوده و با دقت بیشتر می‌توان آن را شناسایی نمود. رنگ بعضی دیگر از مخمرها مانند کاندیدا پاراپسیلوزیس نسبتاً غیر اختصاصی بوده و نمی‌توان از روی مرفولوژی کلنی آنها را نام‌گذاری نمود. گرچه تفاوت رنگ اندکی بین کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا دابلینینسیس وجود داشت ولی به‌نظر می‌رسد که تنها از روی رنگ کلنی نمی‌توان این دو را از یکدیگر باز شناخت و بایستی از روش دیگری برای افتراق آنها سود جست (۹).

جدول ۲ نتایج شناسایی جدایه‌های مخمری بیمـاران روی محیط کروم آگار کاندیدا را نشان مـی‌دهـد. چنانچـه ملاحظه می‌شود کاندیدا آلبیکنس با ۶۶/۵ درصد بیشترین فراوانی و کاندیدا لوزیتانیا با ۰/۳۵ درصد (فقط یک ایزوله) کمترین فراوانـی را داشـت. بـر اسـاس اطلاعـات نگارنـده، جداسازی کاندیدا لوزیتانیا برای اولین بار در ایران گـزارش می‌شود.

جدول ۲: تعداد و درصد مخمرهای جدا شده و شناسائی شده توسط روش CHROMagar Candida و PCR-RFLP

گونه	تعداد	درصد	روش شناسایی
کاندیدا آلبیکنس	۱۸۵	۶۶/۵	کروم آگار و PCR-RFLP
کاندیدا پاراپسیلوزیس	۲۴	۸/۶	PCR-RFLP
کاندیدا تروپیکالیس	۲۴	۸/۲	کروم آگار و PCR-RFLP
کاندیدا گلابراتا	۱۷	۶/۱	کروم آگار و PCR-RFLP
کاندیدا کروزه‌ای	۱۳	۴/۶	کروم آگار و PCR-RFLP
کاندیدا کفیر	۷	۲/۵	PCR-RFLP
کاندیدا گیلیرموندی	۲	۰/۷	PCR-RFLP
کاندیدا لوزیتانیا	۱	۰/۳۵	PCR-RFLP
کریپتوکوکوس نئوفورمنس	۱	۰/۳۵	PCR-RFLP
تعداد کل	۲۷۴	-	-

برخی از نمونه‌ها حـاوی بـیش از یـک مخمـر بـود کـه در جدول ۳ درج شده است.

جدول۳: تعداد و درصد مخمرهای مخلوط جدا شده و شناسائی شده توسط روشCHROMagar Candida وPCR-RFLP

گونه	تعداد	درصد
کاندیدا آلبیکنس + کاندیدا تروپیکالیس	۲	۰/۷
کاندیدا آلبیکنس + کاندیدا کروزه‌ای	۱	۰/۳۵
کاندیدا آلبیکنس + کاندیدا گیلیرموندی	۱	۰/۳۵
کاندیدا آلبیکنس + کاندیدا گلابراتا	۱	۰/۳۵
کاندیدا کفیر + کاندیدا پاراپسیلوزیس	۱	۰/۳۵
تعداد کل	۶	-

با توجه به این که محیط کروم آگـار کاندیـدا فقـط بـرای شناسـائی مخمرهـای کاندیـدا آلبیکـنس، کاندیـدا تروپیکالیس، کاندیدا کـروزه‌ای و کاندیـدا گلابراتـا اعتبـار کـافی دارد، سـایر مخمرهـا بـه روش PCR-RFLP شناسائی شد. نتایج قطعـی حاصـل از روش کـروم‌آگـار بـا نتایج حاصل از PCR، کاملاً هماهنگی داشت به طوری که همهٔ جدایه‌هایی کـه بـا روش کـروم آگـار تـشخیص داده شـده بـود، بـا روش PCR-RFLP نیـز بـا همـان هویـت شناسـایی شـدند. سـایر جدایـه‌هـا فقـط بـه روش دوم مورد شناسایی قرار گرفتند که نتایج در جـدول ۲ منـدرج است.

بحث:

عفونت‌های فرصت‌طلب ناشی از مخمرها در دهه‌های اخیر اهمیت زیادی یافته است (۲). علت این مسئله روند رو به تزاید این عفونت‌ها از لحاظ بروز و شیوع در جامعه و در بین عفونت‌های بیمارستانی است. بیماری‌های ناتوان کننده‌ای مثل ایدز، دیابت ملیتوس و بدخیمی‌ها و نیز افزایش کاربرد کاتترهای وریدی، پیوند اعضاء، داروهای ضد سرطان، آنتی بیوتیک‌های وسیع‌الطیف و درمان با کورتیکو استروئیدها از جمله زمینه‌های مساعد کننده ابتلا به عفونت‌های مخمری است (۴). اهمیت شناسائی عوامل قارچی متنوع این عفونت‌ها را در چند جهت می‌توان خلاصه نمود: ۱) برخی از اشکال بالینی خاص با برخی از عوامل خاص مرتبط هستند. به عنوان مثال بیماران مبتلا به لوسمی بیشتر به کاندیدا آلبیکنس مبتلا می‌شوند در صورتی که بیماران واجد تومورهای سخت در معرض خطر بیشتری برای ابتلا به عفونت‌های ناشی از کاندیدا گلابراتا هستند. ۲) ویرولانس هر کدام از گونه‌های مخمری با یکدیگر متفاوت بوده و شرط لازم درک پاتوژنز عفونت‌ها، تعیین هویت عامل علیتی بیماری است(۴). ۳) گونه‌های مختلف نسبت به داروهای ضد قارچی حساسیت متفاوتی دارند. به عنوان مثال حساسیت کاندیدا تروپیکالیس و کاندیدا گلابراتا نسبت به فلوکونازول ۳۲-۴ برابر کمتر از کاندیدا آلبیکنس است (۱۰). همچنین کاندیدا لوزیتانیا دارای مقاومت نسبی ذاتی به آمفوتریسین B است (۴،۱۱). پیدا کردن منابع عفونت و درک راه‌های انتقال بیماری به ویژه در طغیان‌های بیمارستانی مستلزم شناسائی گونه‌ها است (۴).

تا آنجا که نویسندگان مقاله اطلاع دارند، در کشور ما تشخیص آزمایشگاهی عفونت‌های مخمری تنها درحد شمارش کلنی و ندرتاً در حد افتراق کاندیدا آلبیکنس از بقیه است و شناسائی سایر گونه‌ها تنها محدود به چند پایان‌نامه تحصیلی بوده است. علت این مسئله بالا بودن هزینهٔ شناسایی مخمرها و وقت‌گیر بودن روش‌های مربوطه و تا حدودی نیز به کم بودن اطلاعات و امکانات استفاده از روش‌های جدیدتر باز می‌گردد.

در میان روش‌های ساده تشخیص گونه‌های شایع و مهم مخمرها، روش کشت روی محیط کروم‌آگار کاندیدا بسیار ساده و در عین حال معتبر به نظر می‌رسد. پس از کشت مخمرها روی این محیط، کلنی‌های کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا تروپیکالیس و کاندیدا کروزه‌ای به ترتیب به رنگ‌های سبز، آبی خاکستری و صورتی و سایر مخمرها به رنگ غیراختصاصی سفید، خاکستری و غیره رشد می‌کنند. تنوع رنگ‌های ایجاد شده مربوط به واکنش بین آنزیم‌های اختصاصی هر گونه با سوبستراهای رنگ‌زای موجود در محیط کشت است. از زمان معرفی این محیط مطالعات متعددی برای ارزیابی کارآمدی آن و یا استفاده از آن در بررسی‌های اپیدمیولوژیک انجام شده است (۱۲-۱۰).

در مطالعه حاضر استرین‌های شناسنامه‌دار مربوط به ۹ گونه مخمری که تقریباً تمامی مخمرهای مهم پزشکی را در بر می‌گیرد روی محیط کروم‌آگار کاندیدا کشت داده شد و کلنی‌های رنگی حاصله مورد مطالعه قرار گرفت. مرفولوژی این کلنی‌ها روی محیط مزبور می‌تواند راهنمای اولیه برای شناسائی آنها باشد ضمن این که برای ۳ یا ۴ گونه نیز کاملاً اختصاصی بوده و برای شناسائی آنها می‌توان به این روش بسنده کرد. این ۴ گونه از جمله گونه‌های شایع، تقریباً در همه جای جهان است.

در مطالعه حاضر همچنین ۲۸۰ ایزوله مخمری جدا شده از نمونه‌های جلدی ـ مخاطی یا سیستمیک بیماران، روی محیط مزبور کشت داده شد که بیش از ۸۵ درصد آنها فقط با همین روش قابل شناسائی بودند. نتایج مربوط به وفور مخمرها با مطالعات سایر محققین در کشورهای دیگر انطباق دارد (۴) و نشان دهنده الگوی کم و بیش یکسان شیوع مخمرها در جمعیت‌های مختلف است. سایر مخمرهای کمتر شایع که با کشت روی محیط کروم‌آگار قابل شناسائی نبود به روش PCR-RFLP به طور دقیق شناسایی شد، که نتایج کلی آنها آورده شده است. روش PCR-RFLP نتایج حاصل از شناسائی مخمرها با استفاده از کشت آنها روی کروم‌آگار کاندیدا را تأیید نمود، به طوری که آن گروه از مخمرها که به توصیه شرکت سازنده توسط محیط کروم‌آگار قابل شناسائی است، با روش مولکولی مذکور نیز دقیقاً با همان هویت شناسائی گردیدند. با توجه به مزایای ذیل در مجموع استفاده از محیط کروم آگار کاندیدا برای شناسائی قارچ‌های مخمری شایع، در آزمایشگاه‌های تشخیصی توصیه می‌شود: ۱) استفاده از این محیط بسیار ساده بوده و تنها کافی است مخمر روی آن کشت داده شده و رنگ کلنی حاصله با چشم مطالعه شود ۲) از این محیط نه تنها برای شناسائی مخمر، بلکه برای جداسازی مخمر از نمونه‌های بالینی نیز میتوان

استفاده کرد ۳) این محیط رایج‌ترین ایزوله‌های مخمری را می‌تواند شناسائی کند و۴) وجود بیش از یک گونه مخمر در یک نمونه، با این محیط قابل شناسایی است. محیط کروم‌آگار در مقایسه با محیط‌های رایج نسبتاً گران قیمت است. یک راه برای کم کردن و کاهش هزینه تهیه محیط کشت این است که نمونه‌ها ابتدا روی محیط‌های رایج قارچ‌شناسی نظیر محیط سابورو جداسازی شده و سپس چندین ایزوله (مثلاً ۴ ایزوله) روی یک پلیت کروم آگار کشت داده شود.

نتیجه نهائی :

به عقیده نویسندگان این مقاله، این محیط برای اهداف اپیدمیولوژیک و پژوهشی که شناسائی دقیق ایزوله‌های شایع تا سطح گونه را مد نظر دارد معتبر و مفید بوده ولی شناسایی کلیه گونه‌ها با این محیط امکان پذیر نبوده و عندالزوم باید از سایر متدهای فنوتیپیک یا ژنوتیپیک کمک گرفت.

سپاسگزاری :

این پژوهش با استفاده از اعتبارات معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران طی طرح تحقیقاتی شماره ۱۲۳۰ انجام شده است. از همکاری همهٔ مسئولین این معاونت تشکر می‌شود. همچنین از خانمها خوشقدم امیدی و نیلوفر جلالی به خاطر کمک‌های بی‌دریغشان صمیمانه متشکریم.

منابع :

1. Price MF, LaRocco MT, Gentry L.O. Fluconazole susceptibilities of Candida species and distribution of species recovered from blood cultures over a 5-year period. Antimicrob Agents Chemother 1994 Jun; 38(6):1422-4
2. Pfaller MA, Epidemiology of candidiasis. J Hosp Infect. 1995 Jun; 30 Suppl: 329-38. Review.
3. Wingard JR, Importance of Candida species other than C. albicans as pathogens in oncology patients. Clin Infect Dis. 1995 Jan; 20(1):115-25. Revie
4. Calderone R.A. Candida and Candidiasis. Washington: ASM Press, 2002.
5. Reiss E, Tanaka K, Bruker G, Chazalet V, Coleman D, Debeaupuis JP et al. Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections. Med Mycol. 1998; 36 Suppl 1:249-57
6. Yeo SF, Wong B. Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections.Clin Microbiol Rev. 2002 Jul; 15(3):465-84.
7. Odds FC. Bernaerts R. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important Candida species. J Clin Microbiol 1994; 32:1923-1929
8. Mirhendi H, Kordbacheh P, Kazemi B, Samiei S, Pezeshki M, Khorramizadeh MR. A PCR-RFLP Method to Identification of the Important Opportunistic Fungi: Candida Species, Cryptococcus neoformans, Aspergillus fumigatus and Fusarium solani Iranian J Public Health 2001;30(3-4):103-106.
9. Mirhendi H, Makimura K, Zomorodian K, Yamaguchi H. Differentiation of Candida albicans and Candida dubliniensis using a single PCR-Restriction enzyme. Jap J Infect Dis 2005 ;58: 235-257
10. Pfaller, MA. Houston A., Coffman S. Application of CHROMagar Candida for rapid screening of clinical specimens for Candida albicans, Candida tropicalis, Candida krusei, and Candida (Torulopsis) glabrata. J Clin Microbiol 1996;34:58-61.
11. Beighton D, Ludford R, Clark DT, Brailsford SR, Pankhurst CL, Tinsley GF, et al. Use of CHROMagar Candida medium for isolation of yeasts from dental samples. J Clin Microbiol 1995 Nov; 33(11):3025-7.
12. Bernal S, Martin Mazuelos E, Garcia M, Aller AI, Martinez MA, Gutierrez MJ. Evaluation of CHROMagar Candida medium for isolation and presumptive identification of species of Candida of clinical importance. Diagn Microbiol Infect Dis 1996;24:201-204.