

# Identificación de levaduras de interés clínico en el medio de cultivo CHROMagar *Candida*

Pedro García-Martos<sup>1</sup>, Rebeca García-Agudo<sup>1</sup>, José Manuel Hernández-Molina<sup>2</sup>, Pilar Marín<sup>1</sup>, Esperanza Tallero<sup>1</sup> y José Mira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz y <sup>2</sup>Hospital La Inmaculada, Huerca Overa, Almería, Almería, España

## Resumen

Se evaluó la utilidad del medio de cultivo CHROMagar *Candida* en la identificación presuntiva de levaduras. Ensayamos 36 especies diferentes, pertenecientes a nueve géneros: un *Blastoschizomyces*, 20 *Candida*, cinco *Cryptococcus*, dos *Geotrichum*, un *Kloeckera*, dos *Pichia*, tres *Rhodotorula*, un *Saccharomyces* y un *Trichosporon*, para determinar el color y las características de las colonias en este medio. Posteriormente, identificamos 2.230 cepas, aisladas directamente sobre CHROMagar *Candida* a partir de muestras clínicas, considerando la coloración, textura y morfología de las colonias después de 72 horas. Estos resultados se compararon con los obtenidos mediante los métodos usuales para la identificación de levaduras. La sensibilidad y especificidad fueron ambas superiores al 97% para el conjunto de las cepas, para *Candida albicans* del 100% y 100%, para *Candida glabrata* del 97,3% y 99,9%, para *Candida krusei* del 92,3% y 99,6%, para *Candida parapsilosis* del 90,3% y 99,6%, y para *Candida tropicalis* del 100% y 100%. El medio CHROMagar *Candida* resultó de gran utilidad para el cultivo de muestras clínicas, y su empleo para la identificación de levaduras mostró un rendimiento del 97,5%, cercano al 100% de los métodos convencionales.

Levaduras, CHROMagar *Candida*, Identificación

## Identification of yeasts of clinical interest on CHROMagar *Candida* culture medium

## Summary

The efficiency of CHROMagar *Candida* was evaluated as a medium for the presumptive identification of yeasts. We tested 36 different yeast species, pertaining to 9 genera: one *Blastoschizomyces*, 20 *Candida*, five *Cryptococcus*, two *Geotrichum*, one *Kloeckera*, two *Pichia*, three *Rhodotorula*, one *Saccharomyces* and one *Trichosporon*, to determine the colony colors and characteristics on this medium. Afterwards, we identified 2.230 strains isolated directly on CHROMagar *Candida* from clinical samples by specific colouration and morphology of the colonies after 72 hours. Their results were compared with standard methods for the identification of yeasts. The sensitivity and specificity were both superior to 97% for all strains, 100% and 100% for *Candida albicans*, 97.3% and 99.9% for *Candida glabrata*, 92.3% and 99.6% for *Candida krusei*, 90.3% and 99.6% for *Candida parapsilosis*, and 100% and 100% for *Candida tropicalis*. CHROMagar *Candida* is a very useful medium for the culture of clinical samples; its use for identification of yeasts has an accuracy of 97.5%, close to 100% of conventional methods.

## Key words

Yeasts, CHROMagar *Candida*, Identification

Aunque *Candida albicans* sigue siendo, entre las levaduras, la especie predominante en muestras clínicas, se están documentando cada vez más infecciones causadas por otras especies que presentan mayor resistencia a los azoles, lo que justifica la importancia de la identificación correcta de las distintas especies. El estudio de la morfología colonial en medios de cultivo sólidos constituye una

base importante para el reconocimiento y la identificación presuntiva de muchas levaduras, pero resulta insuficiente si no se acompaña de otros recursos disponibles, principalmente la investigación de las características nutricionales. Algunos medios de cultivo diferenciales pueden ofrecer mejor rendimiento que el clásico agar de Sabouraud, como es el caso del medio de Nickerson o agar BiGGY con sulfito de bismuto [1] y el medio de Pagano y Levin con trifeniltetrazolio [2]. En los últimos años se han comercializado varios medios de cultivo fluorogénicos y cromogénicos para la identificación de *C. albicans* y de otras especies de levaduras, los cuales ponen de manifiesto la actividad sobre enzimas específicas y permiten una buena discriminación entre las distintas especies presentes en cultivos mixtos: agar molibdato

## Dirección para correspondencia:

Dr. Pedro García-Martos  
Calle Ana de Viya, 13-2B, 11009 Cádiz, España.  
Tel.: +34-956 285 445; Fax: +34-956 242 220

Aceptado para publicación el 20 de abril de 1998

[3, 4], Yeast Medium Aniline Blue [5,6], Fluoroplate [7,8], MUAG [9], Candichrom [10], Albicans ID [8-14], Candiselect [14].

El medio de cultivo CHROMagar Candida (CHROMagar, Francia) es uno de estos medios cromogénicos capaz de identificar *C. albicans* y diferenciar otras levaduras de interés clínico de acuerdo con el color de las colonias. Según diversos estudios de evaluación, este medio parece ser de gran utilidad para la identificación presuntiva de *C. albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* y *Candida krusei*, principalmente [11,14-23]. Nosotros lo hemos evaluado frente a 36 especies de levaduras incluídas en los géneros: *Candida*, *Cryptococcus*, *Geotrichum*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* y *Trichosporon*, con el fin de establecer el morfotipo colonial específico de cada especie. Por otra parte, hemos intentado identificar directamente sobre este medio 2.230 levaduras, aisladas de muestras clínicas en diagnóstico seriado de rutina, para comprobar su rendimiento en la identificación frente al empleo de métodos convencionales como el estudio de las características morfológicas, la tolerancia a la cicloheximida y la fermentación y asimilación de compuestos de carbono.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se determinó el morfotipo colonial sobre el medio de cultivo CHROMagar Candida (Becton-Dickinson) de 36 especies diferentes de levaduras, pertenecientes a nueve géneros: un *Blastoschizomyces*, 20 *Candida*, cinco *Cryptococcus*, dos *Geotrichum*, un *Kloeckera*, dos *Pichia*, tres *Rhodotorula*, un *Saccharomyces* y un *Trichosporon*, tras identificarlas mediante el estudio de sus características morfológicas (morfotipo colonial, blastesis, formación de cápsula, blastosporas, hifas/pseudohifas, artrosporas y ascosporas), fisiológicas (tolerancia a cicloheximida), bioquímicas (hidrólisis de urea y reducción de nitrato) y nutricionales (fermentación y asimilación de compuestos de carbono), utilizando métodos convencionales y el sistema comercial ATB ID32C (Bio-Mérieux). Estas cepas procedían de muestras clínicas, incluídas heces, y muestras ambientales, principalmente agua del mar. Una vez establecida la identidad de las cepas, se cultivaron en agar Sabouraud (Difco, USA) durante 48 h a 30°C, y a partir del cultivo se efectuó una suspensión en agua destilada estéril hasta alcanzar una concentración de  $10^7$  ufc/ml, la cual fue inoculada sobre la superficie del medio CHROMagar Candida. Los cultivos se incubaron a 30°C y fueron examinados a las 24, 48 y 72 h, apreciando en las colonias la presencia o ausencia de color junto a otras características de textura, morfología colonial y actuación sobre el medio produciendo halo por cambio de pH. Se ensayaron también seis cepas de colección como control de la metodología utilizada: *C. albicans* ATCC 752, *C. glabrata* ATCC 2001, *C. krusei* ATCC 24408, *C. parapsilosis* ATCC 7330, *C. tropicalis* ATCC 750 y *Cryptococcus neoformans* ATCC 2344.

Para evaluar el rendimiento del medio CHROMagar Candida, se estudiaron de manera prospectiva 2.230 cepas de levaduras obtenidas de distintas muestras clínicas de pacientes atendidos en el Hospital Universitario Puerta del Mar de Cádiz, procesadas en nuestro laboratorio para diagnóstico de rutina. Las muestras se cultivaron directamente sobre agar de Sabouraud con cloranfenicol para confirmar la presencia de levaduras y sobre CHROMagar Candida, estudiando las características morfológicas y cromogénicas de las colonias a las 72 h de incubación a 30°C. De acuerdo con el morfotipo

observado en este medio, se determinó presuntivamente la especie y se procedió a confirmar la identificación mediante métodos convencionales. Con los resultados obtenidos en el medio CHROMagar Candida determinamos los índices de sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo, en relación con los métodos convencionales, entendiendo por sensibilidad la capacidad de identificar correctamente una especie sobre el medio CHROMagar Candida y por especificidad la capacidad de obtener un resultado negativo cuando éste es el esperado; el valor predictivo positivo expresado en porcentaje resulta de aplicar la fórmula:  $PT/PT+PF$ , considerando como PT los resultados positivos totales o número de cepas asignadas a una especie concreta y como PF los resultados positivos falsos o errores en la identificación.

## RESULTADOS

El espectro de colores obtenidos en el medio CHROMagar Candida fue variado: blanco, verde, azul, rosa, beige y lila, con variaciones de intensidad en algunos de estos colores. En la tabla 1 se reflejan las tonalidades de color, textura y morfología colonial, correspondientes a cada una de las 36 especies ensayadas para establecer el morfotipo colonial. Como se observa, las coloraciones rosadas y blanquecinas son a menudo compartidas por las colonias de distintas especies, dificultando la diferenciación entre ellas cuando no se aprecian otras características de cultivo. Considerando conjuntamente el color, la textura y la morfología de las colonias, los morfotipos correspondientes a *Blastoschizomyces capitatus*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *Candida lipolytica*, *Candida lusitaniae*, *Candida pelliculosa*, *C. tropicalis*, *Candida zeylanoides*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus humicolus*, *Cryptococcus laurentii*, *C. neoformans*, *Cryptococcus uniguttulatus*, *Geotrichum candidum*, *Geotrichum klebahnii*, *Kloeckera apiculata*, *Pichia ohmeri*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Trichosporon beigei*, son bastante específicos de especie.

En la tabla 2 se muestran los morfotipos coloniales obtenidos en el medio CHROMagar Candida para las 2.230 cepas estudiadas, relacionando las especies identificadas presuntivamente sobre este medio con las confirmadas tras aplicar la metodología convencional. De acuerdo con estos resultados, el medio CHROMagar Candida ofrece un índice de sensibilidad del 97,5% para el conjunto de las cepas, y una especificidad del 97,6%. En la tabla 3 se expresan los índices de sensibilidad, especificidad y el valor predictivo positivo para las especies más frecuentes en muestras clínicas.

## DISCUSIÓN

Los medios de cultivo diferenciales, basados en las distintas tonalidades de color que adquieren las colonias de muchos microorganismos al actuar sobre determinados componentes del medio, están cada vez más en auge. Las principales ventajas de estos medios son la detección de un patógeno determinado en una muestra y el reconocimiento de mezclas de microorganismos con características coloniales muy similares. En el caso de las levaduras, sobre todo en el género *Candida*, se vienen utilizando desde hace años, como medios selectivos para su detección, aislamiento y diferenciación, el medio de Nickerson [24,25], el medio de Harold y Snyder [26] y, especialmente, el medio de Pagano y Levín [24,27-31]. El medio CHROMagar Candida ha sido suficientemente evaluado y demostrada su eficacia [14-23].

**Tabla 1.** Características de color, textura y morfología colonial de 36 especies de levaduras cultivadas en medio CHROMagar *Candida*.

Género/especie	Número de cepas	Morfotipo de las colonias
<i>Blastoschizomyces</i>	3	
<i>B. capitatus</i>	3	Blanco, rugosas
<i>Candida</i>	610	
<i>C. albicans</i>	348	Verde esmeralda
<i>C. catenulata</i>	1	Rosa claro, mates
<i>C. glabrata</i>	4	Lila, mates
<i>C. famata</i>	12	Rosa claro, mates
<i>C. globosa</i>	1	Blanco crema, mates
<i>C. guilliermondii</i>	10	Rosa claro, brillantes
<i>C. inconspicua</i>	2	Rosa claro, rugosas
<i>C. intermedia</i>	2	Rosa claro, rugosas
<i>C. kefyr</i>	6	Beige, mates
<i>C. krusei</i>	30	Rosa claro, rugosas, borde extendido
<i>C. lambica</i>	1	Rosa claro, mates
<i>C. lipolytica</i>	9	Blanco rosado, rugosas, naviculares
<i>C. lusitaniae</i>	4	Lila, brillantes
<i>C. norvegensis</i>	2	Rosa claro, rugosas
<i>C. parapsilosis</i>	54	Rosa claro, mates/arrugadas
<i>C. pelliculosa</i>	6	Lila, rugosas
<i>C. tropicalis</i>	83	Azul rosado, mates, halo alrededor
<i>C. utilis</i>	1	Blanco crema, mates
<i>C. valida</i>	2	Rosa, rugosas, borde extendido
<i>C. zeylanoides</i>	2	Azul, brillantes
<i>Cryptococcus</i>	20	
<i>C. albidus</i>	5	Rosa lila, brillantes
<i>C. humicolus</i>	2	Rosa grisáceo, brillantes, arrugadas
<i>C. laurentii</i>	4	Lila, brillantes
<i>C. neoformans</i>	6	Blanco crema, brillantes
<i>C. uniguttulatus</i>	3	Blanco crema, mates
<i>Geotrichum</i>	5	
<i>G. candidum</i>	3	Blanco, aterciopeladas
<i>G. klebahnii</i>	2	Rosa azulado, aterciopeladas
<i>Kloeckera</i>	3	
<i>K. apiculata</i>	3	Lila, muy pequeñas, halo alrededor
<i>Pichia</i>	5	
<i>P. farinosa</i>	2	Crema rosado, mates
<i>P. ohmeri</i>	3	Rosa azulado, rugosas
<i>Rhodotorula</i>	28	
<i>R. glutinis</i>	12	Rojo coral a salmón
<i>R. mucilaginoso</i>	15	Rojo coral a salmón
<i>R. minuta</i>	1	Salmón a naranja
<i>Saccharomyces</i>	6	
<i>S. cerevisiae</i>	6	Lila, mates, halo alrededor
<i>Trichosporon</i>	6	
<i>T. beigellii</i>	6	Turquesa, rugosas, halo alrededor

De acuerdo con los hallazgos de algunos autores, encontramos que el medio CHROMagar *Candida* es de gran utilidad para la identificación de las especies de *Candida* más habituales en muestras clínicas: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. glabrata*, excluyendo a *C. parapsilosis* [14,19,20]; otros autores cuestionan su eficacia para la identificación de *C. glabrata* [15,17,18]. Según nuestra experiencia, este medio es adecuado igualmente para la identificación presuntiva de otras especies menos frecuentes; de las 36 especies ensayadas en este estudio, se pueden diferenciar con cierta precisión hasta 21 de ellas considerando no sólo el color, sino también la textura y morfología de las colonias. El color de las colonias de algunas levaduras puede variar ligeramente de un día a otro, por lo que es importante fijar el tiempo de observación. Nosotros efectuamos la lectura de las placas a las 72 h para apreciar el color, y luego prolongamos el cultivo hasta los cinco días para apreciar mejor otras características de las colonias. Las coloraciones rosa, lila y blanca, son las compartidas por un mayor número de especies y las que ofrecen mayor dificultad interpretativa, siendo necesario recurrir a otras peculiaridades para orien-

tar la identificación, tales como la rugosidad y el borde extendido en las colonias de *C. krusei*, el halo alrededor de las colonias de *C. tropicalis* o el tamaño de las colonias de *Kloeckera apiculata*. Las levaduras pertenecientes a los géneros *Cryptococcus*, *Geotrichum* y *Rhodotorula* se reconocen con cierta facilidad en cualquier medio micológico, pero el medio CHROMagar *Candida* ayuda bastante a la diferenciación de especies dentro de los géneros *Cryptococcus* y *Geotrichum*, ya que los morfotipos coloniales de las especies estudiadas presentan rasgos específicos.

El empleo de este medio para la identificación rutinaria de aislamientos clínicos ofrece, pues, un excelente rendimiento, con un alto porcentaje de aciertos en la determinación de la especie (97,5%) en comparación con el teórico 100% atribuido a los métodos convencionales. En la mayoría de las especies frecuentes en clínica, los índices de sensibilidad y especificidad son tan excelentes que podría prescindirse de otras pruebas de identificación como la formación de tubos germinativos, la producción de clamidosporas y la fermentación y asimilación de compuestos de carbono, sobre todo cuando no fuera necesario

**Tabla 2.** Morfotipo en el medio de CHROMagar Candida de 2.230 cepas de levaduras: identificación presuntiva de especies y confirmación por métodos convencionales.

Morfotipo colonial	Número de cepas	Especie sospechada	Especie confirmada
Verde esmeralda	1.235	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> (1.235)
Rosa grisáceo, brillantes	3	<i>C. humicolus</i>	<i>C. humicolus</i> (3)
Azul rosado, mates, halo	198	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i> (198)
Azul, brillantes	1	<i>C. zeylanoides</i>	<i>C. zeylanoides</i> (1)
Turquesa, rugosas, halo	16	<i>T. beigelii</i>	<i>T. beigelii</i> (16)
Rojo coral a salmón	20	<i>Rhodotorula</i> spp.	<i>Rhodotorula</i> spp. (20)
Lila, brillantes	4	<i>C. laurentii</i>	<i>C. laurentii</i> (3)
			<i>C. glabrata</i> (1)
Lila, mates	262	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i> (255)
			<i>C. lusitaniae</i> (4)
			<i>C. pelliculosa</i> (2)
			<i>C. laurentii</i> (1)
Lila, mates, halo	7	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i> (6)
			<i>C. glabrata</i> (1)
Lila, rugosas	1	<i>C. pelliculosa</i>	<i>C. pelliculosa</i> (1)
Lila, pequeñas, halo	2	<i>K. apiculata</i>	<i>K. apiculata</i> (2)
Beige, mates	3	<i>C. kefir</i>	<i>C. kefir</i> (3)
Rosa azulado, rugosas	1	<i>P. ohmeri</i>	<i>P. ohmeri</i> (1)
Rosa azulado, aterciopeladas	2	<i>G. klebahnii</i>	<i>G. klebahnii</i> (2)
Rosa lila, brillantes	4	<i>C. albidus</i>	<i>C. albidus</i> (4)
Rosa claro, brillantes	14	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. guilliermondii</i> (11)
			<i>C. parapsilosis</i> (3)
Rosa claro, mates	235	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i> (203)
			<i>C. famata</i> (18)
			<i>C. guilliermondii</i> (11)
			<i>P. farinosa</i> (3)
Rosa claro, rugosas	104	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i> (96)
			<i>C. inconspicua</i> (3)
			<i>C. norvegensis</i> (3)
			<i>C. intermedia</i> (1)
			<i>C. valida</i> (1)
Rosa claro, arrugadas	92	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i> (92)
Blanco rosado, rugosas	3	<i>C. lipolytica</i>	<i>C. lipolytica</i> (3)
Blanco crema, brillantes	14	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i> (14)
Blanco crema, rugosas	6	<i>B. capitatus</i>	<i>B. capitatus</i> (4)
			<i>C. uniguttulatus</i> (2)
Blanco, aterciopeladas	3	<i>G. candidum</i>	<i>G. candidum</i> (2)
			<i>B. capitatus</i> (1)

**Tabla 3.** Rendimiento del medio de cultivo CHROMagar Candida en la identificación de especies de levaduras frecuentes en muestras clínicas.

Especie	Sensibilidad	Especificidad	Valor predictivo positivo
<i>Candida albicans</i>	100%	100%	100%
<i>Candida glabrata</i>	97,3%	99,9%	97,4%
<i>Candida krusei</i>	92,3%	99,6%	92,6%
<i>Candida parapsilosis</i>	90,2%	98,3%	91,1%
<i>Candida tropicalis</i>	100%	100%	100%

precisar con exactitud una determinada especie.

Aunque, sin duda, la elección de un medio cromogénico depende del tipo de muestras para cultivo (con flora polifúngica o monofúngica) y de la prevalencia de las distintas especies en esas muestras, podemos afirmar que la utilización del medio CHROMagar Candida en sustitución del habitual agar de Sabouraud facilita en mayor medida el estudio de la morfología colonial y permite diferenciar con más precisión, e incluso identificar, las distintas especies de levaduras presentes en muestras clí-

nicas, aparte de permitir la detección de flora polifúngica. En general, cabe la posibilidad de prescindir, en muchas ocasiones, de pruebas adicionales para llegar a la identificación de algunas especies, y en concreto de las más comunes como *C. albicans* y *C. tropicalis*, con el consiguiente ahorro económico.

## Bibliografía

1. Nickerson WJ. Reduction of inorganic substances by yeasts. Extracellular reduction of sulfite by species of *Candida*. *J Infect Dis* 1953; 93: 43-44.
2. Pagano J, Levin D, Trejo W. Diagnostic medium for the differentiation of species of *Candida*. *Antibiot Annu* 1958; 6: 137-143.
3. Costa SO, de Lourdes Branco C. Evaluation of a molybdenum culture medium as selective and differential for yeasts. *J Pathol Bacteriol* 1964; 87: 428-431.
4. Brump CM, Kunz LJ. Routine identification of yeasts with the aid of molybdate-agar medium. *Appl Microbiol* 1968; 16: 1503-1506.
5. Fung DYC, Liang C. A new fluorescent agar for the isolation of *Candida albicans*. *Bull Inf Lab Serv Vet (France)* 1988; 29: 1-2.
6. Goldschmidt MC, Fung DYC, Grant R, White J, Brown T. New aniline blue dye medium for rapid identification and isolation of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 1095-1099.
7. Manafi M, Willinger B. Rapid identification of *Candida albicans* by Fluoroplate candida agar. *J Microbiol Methods* 1991; 14: 103-107.
8. Rousselle P, Freydiere AM, Couillerot PJ, de Montclos H, Gille Y. Rapid identification of *Candida albicans* by using *Albicans* ID and Fluoroplate agar plates. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 3034-3036.
9. Willinger B, Manafi M, Rotter ML. Comparison of rapid methods using fluorogenic-chromogenic assays for detecting *Candida albicans*. *Lett Appl Microbiol* 1994; 18: 47-49.
10. Waller J, Koenig H, Debruyne M, Contant G. Evaluation d'un nouveau milieu d'isolement des levures et de diagnostique rapide de *Candida albicans*. *Rev Fr Lab* 1993; 252: 89-92.
11. Baumgartner C, Freydiere AM, Gille Y. Direct identification and recognition of yeast species from clinical material by using *albicans* ID and CHROMagar Candida plates. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 454-456.
12. De Champs C, Lebeau B, Grillot R, Ambroise-Thomas R. Evaluation of Albicans ID plates. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2227-2228.
13. Lipperheide V, Andracka L, Ponton J, Quindos G. Evaluation of the Albicans ID plate method for the rapid identification of *Candida albicans*. *Mycoses* 1993; 36: 417-420.
14. Freydiere AM, Buchaille L, Gille Y. Comparison of three commercial media for direct identification and discrimination of *Candida* species in clinical specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16: 464-467.
15. 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.
16. Beighton D, Ludford R, Clark DT, *et al.* Use of CHROMagar Candida medium for isolation of yeasts from dental samples. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 3025-7.
17. Freydiere AM. Evaluation of CHROMagar Candida plates. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2048.
18. San-Millan R, Ribacoba L, Ponton J, Quindos G. Evaluation of a commercial medium for identification of *Candida* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15: 153-158.
19. Pfaller MA, Houston A, Coffmann 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.
20. Bernal S, Martin Mazuelos E, Garcia M, Aller AI, Martinez MA, Gutierrez MJ. Evaluation of CHROMagar Candida medium for the isolation and presumptive identification of species of *Candida* of clinical importance. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1996; 24: 201-204.
21. Shopova E, Ioneva M. Vurza identifikatsiia na vidove ot rod *Candida*. *Akush Ginekol (Sofia)* 1996; 35: 36-37.
22. García-Martos P, Mira-Gutiérrez J, Galán-Sánchez F, Hernández-Molina JM. Utilidad del medio de cultivo CHROM-agar Candida para la diferenciación e identificación presuntiva de levaduras de interés clínico. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1996; 15: 70-72.
23. Casal M, Linares MJ, Solis F, Rodriguez FC. Appearance of colonies of *Prototheca* on CHROMagar Candida medium. *Mycopathologia* 1997; 137: 79-82.
24. Mendel EB, Haberman S, Hall DK. Isolation of *Candida* from clinical specimens. Comparative study of Pagano-Levin and Nickerson's culture media. *Obstet Gynecol* 1960; 16: 180-184.
25. O'Brien JR. Nickerson's medium in the diagnosis of vaginal moniliasis. *Can Med Assoc* 1964; 90: 1073-1074.
26. Schnell JD. Investigations into the pathobiology and diagnosis of vaginal mycoses. *Chemotherapy* 1982; 28 (Suppl 1): 14-21.
27. Denny MJ, Partridge BM. Tetrazolium medium as an aid in the routine diagnosis of *Candida*. *J Clin Pathol* 1968; 21: 383-386.
28. Sinski JT, Kelley LM, Reed GL. Pagano-Levin *Candida* test medium: evaluation using vaginal samples. *J Clin Microbiol* 1975; 1: 206-211.
29. Yamane N, Saitoh Y. Isolation and detection of multiple yeasts from a single clinical sample by use of Pagano-Levin agar medium. *J Clin Microbiol* 1985; 21: 276-277.
30. Samaranyake LP, McFarlane TW, Williamson MI. Comparison of Sabouraud dextrose and Pagano-Levin agar media for detection and isolation of yeasts from oral samples. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 162-164.
31. Quindós G, Fernández-Rodríguez M, Burgos A, Tellaetxe M, Cisterna R, Pontón J. Colony morphotype on Sabouraud-triphenyltetrazolium agar: a simple and inexpensive method for *Candida* subspecies discrimination. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2748-2752.