المقرر العملي لمادة علم الخمائر

349 حدق

إعداد

بسام النفيسي

الجدول الزمني للمقرر العملي علم الخمائر349حدق

الاسبوع	الموضوع
1	مقدمة عن الامن و السلامة و الامن في المختبرات
2	مقدمة عن علم الخمائر
3	عزل الخمائر من الأوساط الطبيعية
4	البيئات المستخدمة في مختبرات الفطريات و الخمائر
5	الفحص المزرعي و المجهري و الصبغات المفضلة لدى الخمائر
6	أ-الخمائر الأسكية:1-خميرة الخباز و التخمر *Saccharomyces cerevisiae*
7	*2- Schizosacchromyces pombie*
8	*3- Hansenula anomala (Pichia anomala)*
9	*4-Candida sp.(albicans)*
10	*5-Geotrichum sp.*
12	*ب-الخمائر البازيدية:Rhodotorula mucilaginosa*
13	*Cryptococcus neoformans*
14	*Malessez*ia sp. and Trichosporon sp.
15	الاختبار النهائي العملي للمقرر

العملي الأول

مقدمة عن علم الخمائر

***علم الفطريات: هو العلم الذي يختص بدراسة تركيب و تصنيف و طرق تكاثر الأنواع المختلفة من الفطريات و الأهمية الاقتصادية و الطبية لها.**

***تقسم الفطريات حسب الشكل إلى نوعين:**

1-الأعفان Molds

2-الخمائر Yeast

***تتشكل الفطريات حسب أهميتها الطبية و الامراضية إلى 3 أشكال:**

1-الأعفان Molds **2-الخمائرYeast**

3-ثنائية التشكلDimorphic Fungi

في الفطريات ثنائية التشكل تكون خميرية الشكل عند درجة حرارة 37 م و تكون عفن عند25 م.

في هذا المقرر العملي سندرس عن التجارب المهمة في علم الخمائر العملي.

***علم الخمائر: هو العلم الذي يهتم بدراسة الخمائر و طرق تكاثرها و أهميتها الاقتصادية و الصناعية و الطبية.**

***الخمائر: كائنات حية دقيقة حقيقية النواة وحيدة الخلية لا تكون ميسيليوم حقيقي مثل فطريات الأعفان و قد تظهر في صورة سلاسل نتيجة لتكرار عملية التبرعم و عدم انفصال الخلايا عن بعضها البعض أثناء التكاثر و تتراوح الخلايا بين كروية و بيضاوية الشكل ولها جدار محدد يحيط بها وتوجد بداخلها النوية و تتبع الأغلبية العظمى من الفطريات الزقية (الأسكية) و قليل منها في البازيدية .**

*** لاتختلف الخمائر بين بعضها البعض من حيث الشكل الظاهري و التركيب و لكنها تختلف اختلافا كبيرا في الصفات الفسيولوجية و المزرعية.**

*** يستعمل الانسان الخميرة في صناعات متعددة من أهمها الخبز و البيرة و الخل و المشروبات الكحولية وإنتاج بروتين وحيد الخلية Single cell protein(SCP) الذي يستخدم لتغذية الطيور والحيوانات على هيئة علائق و بديل للحوم للإنسان في مطاعم البرجر و يشبه اللحم الأحمر البقري, و تستخدم الخمائر في إنتاج بعض أنواع الفيتامينات مثل فيتامين (ب) المركب و فيتامين (ج) و فيتامين (د) في الخمائر التي تتعرض للأشعة فوق البنفسجية و بعض الأنواع تنتج كميات وافرة من الدهون.**

*** تتغذى بطرق الكيموعضوية وتستخدم المركبات العضوية كمصدر للطاقة حيث تحصل على الكربون عادة من السكريات مثل الجلوكوز و الفركتوز و المالتوز.**

*** خلايا الخميرة تحتاج إلى الأكسجين لتنفس الخلايا تنفس هوائي لإنتاج الطاقة (هوائية اختيارية) كما أنها يمكن أن تتنفس لا هوائيا و لكن لديها طرق هوائية لانتاج الطاقة (هوائية اختيارية) على خلاف البكتريا لا يمكن للخمائر النمو في ظروف لا هوائية فقط (إجبارية لا هوائية).**

*** تفضل النمو في الأوساط الحامضية منخفضة الأس الهيدروجيني.**

*** تختلف من نوع لآخر من حيث درجة الحرارة الملائمة للنمو و لكنها غالبا تفضل النمو في درجات الحرارة من 28م إلى 37 م.**

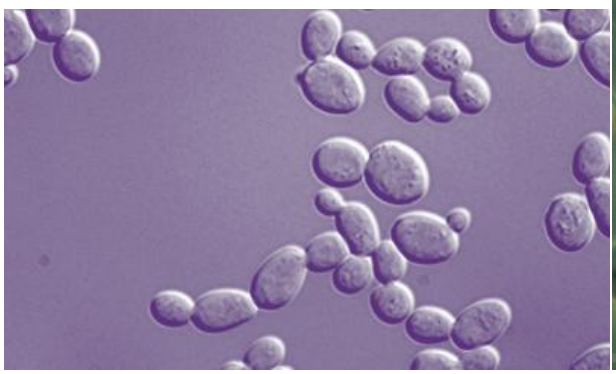
*** تتواجد بصورة كثيفة في كل مكان في الطبيعة و لكنها أقل انتشارا من البكتريا و يمكن عزلها من المحاليل والمواد الغنية بالمواد السكرية كرحيق الأزهار و الفواكه كالعنب و التفاح وتوجد في التربة و الحشرات.**

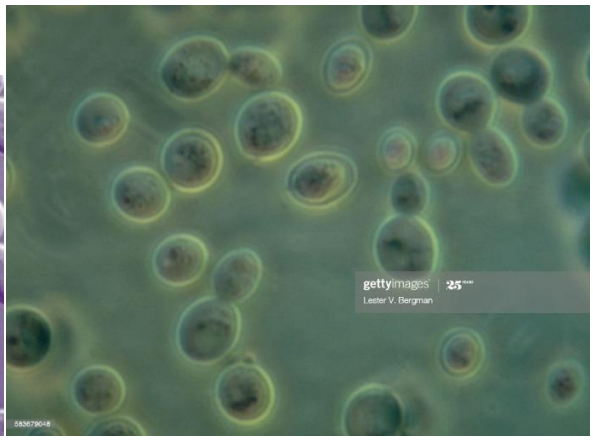
*** التكاثر في الخمائر يكون لا جنسيا و تكون تكاثرها سريعا خاصة في البيئة المحتوية على سكر و يكون تكاثرها بالتبرعم Buddingحيث يكون برعم واحد أو خلية بنوية من الخلية الأم و أثناء التبرعم ينتفخ جزء من جدار الخلية و يكون نموا جديدا يسمى البرعم و ينفصل البرعم بعد ذلك و يكون خلية جديدة حيث تنقسم خلية الأم وتهاجر إلى الخلية البنوية و عدد قليل منها تتكاثر لاجنسيا بالانشطار الثنائي Binary fission.**

تكوين جراثيم داخلية (كلاميدية) في الظروف الصعبة مثل *Saccharomyces sp.

هناك أنواع من الخمائر لا تكون جراثيم مثل *Candida sp.

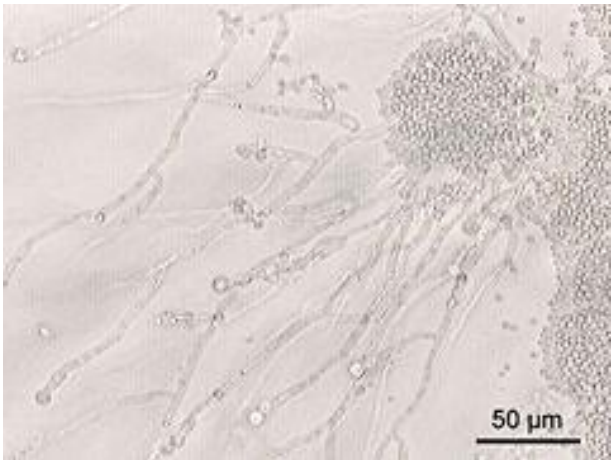
***التكاثر الجنسي غير شائع في الخمائر و يحدث اندماج نواتي الخليتين لتكون نواة ثنائية المجموعة الصبغية ثم تنقسم ثلاث مرات لتكون ثمان أنوية لتكون الحصيلة لنهائية كيس أسكي يحتوي على ثمانية جراثيم أسكية.**

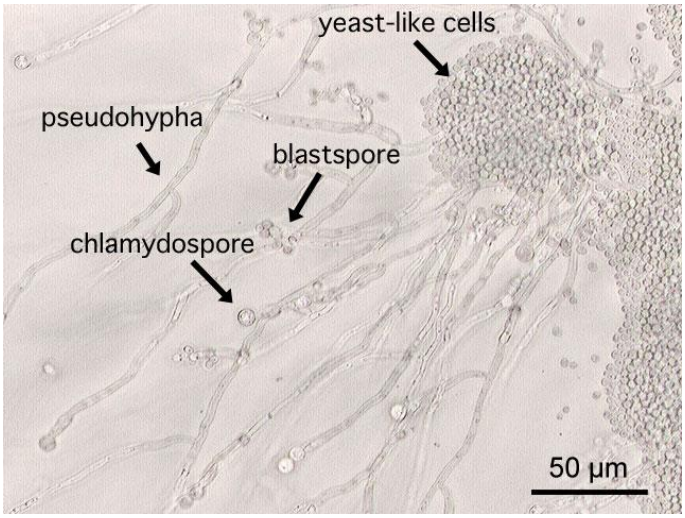




التبرعم في الخمائر Budding Yeast cells

الانشطار الثنائي في الخميرة ***Schizosaccharomyces pombe***





الأبواغ الكلاميدية و البلاستية و الهيفات الكاذبة Chlamydospores and Blastospores and pseudo hyphae in *Candida albicans*

العملي الثاني

عزل الخمائر من الأوساط الطبيعية

اسم التجربة:عزل الخمائر من الأوساط الطبيعية

الهدف من التجربةعزل الخمائر و تنميتها على بيئاتها الخاصة و دراسة شكلها المجهري و المزرعي

الأدوات المستخدمة: عينة من التربة – عينة شعير مخمرة – محاليل سكرية من الفواكه – عينة من الأنف – عينة من الفم – ماسحات قطنية – بيئة Potatoes Dextrose Agar - أطباق بتري معقمة-إبرة ذات عقفة.

طريقة العمل:

1-تحضير بيئة PDA و تعقيمها في Autoclave على درجة حرارة 121 لمدة 20 دقيقة.

2-بعد التعقيم يتم صب البيئات في وضع معقم وتركها حتى تتصلب.

3-بعد تصلب البيئات :

أ-عينة التربة يتم وضعها في ماء حنفية معقم و زن 1 جم من التربة ووضعها في دورق سعة 100مل و رجها جيدا وتركها لمدة 5 دقائق إلى 10 دقائق ثم تضع 1 مل من التربة على سطح الطبق وعمل تخطيط ثلاثي رباعي.

ب-عينة الشعير المخمرة يتم وضع 1 مل من العينة على سطح الطبق وعمل تخطيط ثلاثي رباعي بواسطة إبرة ذات عقة.

ج-عينة الأنف يتم مسح سطح الطبق بواسطة المسحة القطنية و على رأس الطبق لتلقيح العينة داخل الطبق ثم عمل تخطيط ثلاثي رباعي بواسطة الابرة ذات عقفة.

د- عينة الفم يتم مسح سطح الطبق بواسطة المسحة القطنية و على رأس الطبق لتلقيح العينة داخل الطبق ثم عمل تخطيط ثلاثي رباعي بواسطة الابرة ذات عقفة.

ه- عينة المحلول السكري يتم وضع 1 مل من العينة على سطح الطبق وعمل تخطيط ثلاثي رباعي بواسطة إبرة التلقيح ذات عقفة.

4-يتم تحضين الأطباق مقلوبة في الحضانة لمدة 48 ساعة على درجة حرارة37 درجة مئوية أو تحضينهاعلى درجة حرارة الغرفة لمدة 3 أيام و يتم تسجيل النتائج

<u>النتائج:</u> ظهور مستعمرات خميرية على الأطباق بعد ذلك يتم أعادة زراعتها على بيئة Sabroud Dextrose Agar(SDA)من الفم و الأنف.

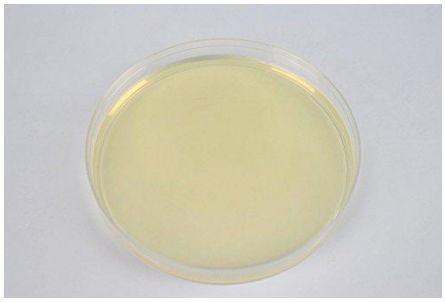
وعند دراسة الأبواغ و الهيفات الكاذبة يتم زراعتها على بيئة Corn Meal Agar

العملي الثالث

البيئات المستخدمة في مختبرات الفطريات و الخمائر

***البيئات المستخدمة في الخمائر:**

1-بيئة Potatoes Dextrose Agar: بيئة عامة لتنمية الخمائر الممرضة و الغير ممرضة ويفضل إضافة روز بنغال لتثبيط نمو البكتريا.



Rose bengal

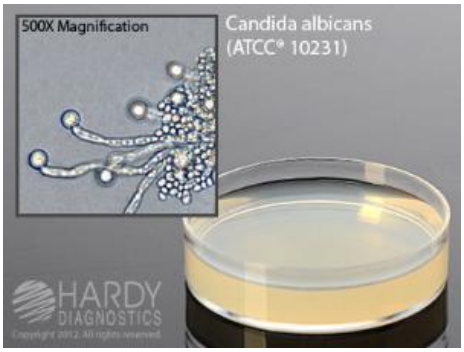
2-بيئة Malt Extract Agar: بيئة عامة لتنمية الخمائر الممرضة و الغير ممرضة وتستخدم في عزل الفطريات التي تسبب فساد الأغذية.

3-بيئة Sabroud Dextrose Agar: بيئة خاصة لعزل الخمائر الممرضة و هي حامضية و تفضل الخمائر النمو فيها

4-بيئة Mycological media slant agar: بيئة خاصة تستعمل لعزل الأعفان من العينات الطبية و تكون في آجار مائل.

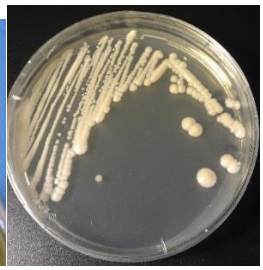
5-بيئة Czapex Dox Media: بيئة عامة للفطريات تستخدم لعزل الفطريات التي تستخدم نترات الصوديوم كمصدر نيتروجيني.

6-بيئة Corn meal agar: بيئة خاصة تستخد للخمائر الممرضة التي تنتج الأبواغ المفصلية البلاستيية و الكلاميدية و الهيفات الكاذبة



7-بيئة Bird seed Agar:بيئة تفريقية لتنمية *cryptococcus neoformans* وتكون النتيجة مستعمرات كريمية سوداء اللون.

***الصفات المزرعية للخمائر: تكون بشكل مستعمرات على سطح الأطباق و بيضاء اللون و كريمية الشكل أو تكون بيضاء و جافة أو تكون كريمية حمراء أو برتقالية اللون و بعضها يكون هيفات كاذبة تشبه فطر الأعفان.**



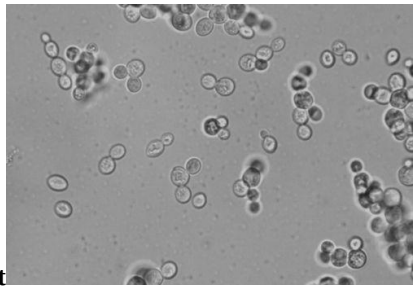
العملى الرابع

الفحص المجهري و الصبغات المفضلة لفحص الخمائر

***الفحص البدائي للخمائر يكون بطريقة الشريحة الرطبة wet prep slide**

***الصبغات المفضلة لفحص الخمائر مجهريا هي الصفرانين و أزرق الميثيلين للخمائر جميعا عدا خميرة *cryptococcus neoformans* نستخدم صبغة الحبر الهندي Indian Ink. و عند صبغ الخمائر بصبغة جرام تكون النتيجة إيجابية Gram positive yeast**

***يكون فحص الخمائر تحت عدسة x60-x40**

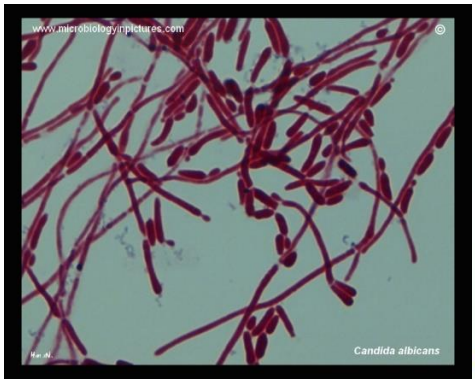


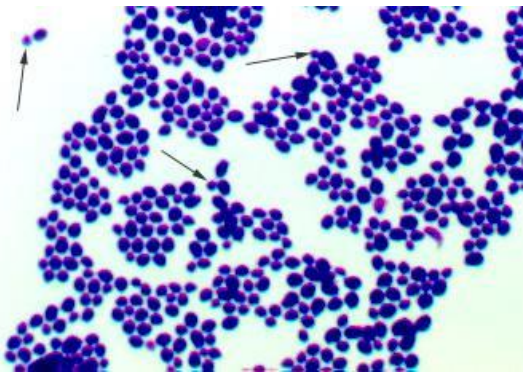
wet prep slide of yeast

Blue methylene

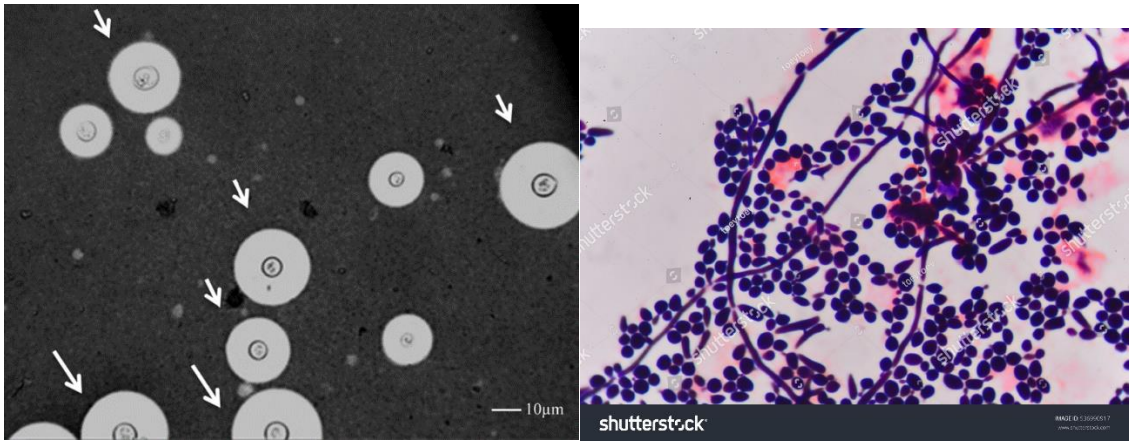
Indian ink

safranin





Yeast blue methylene and safranin



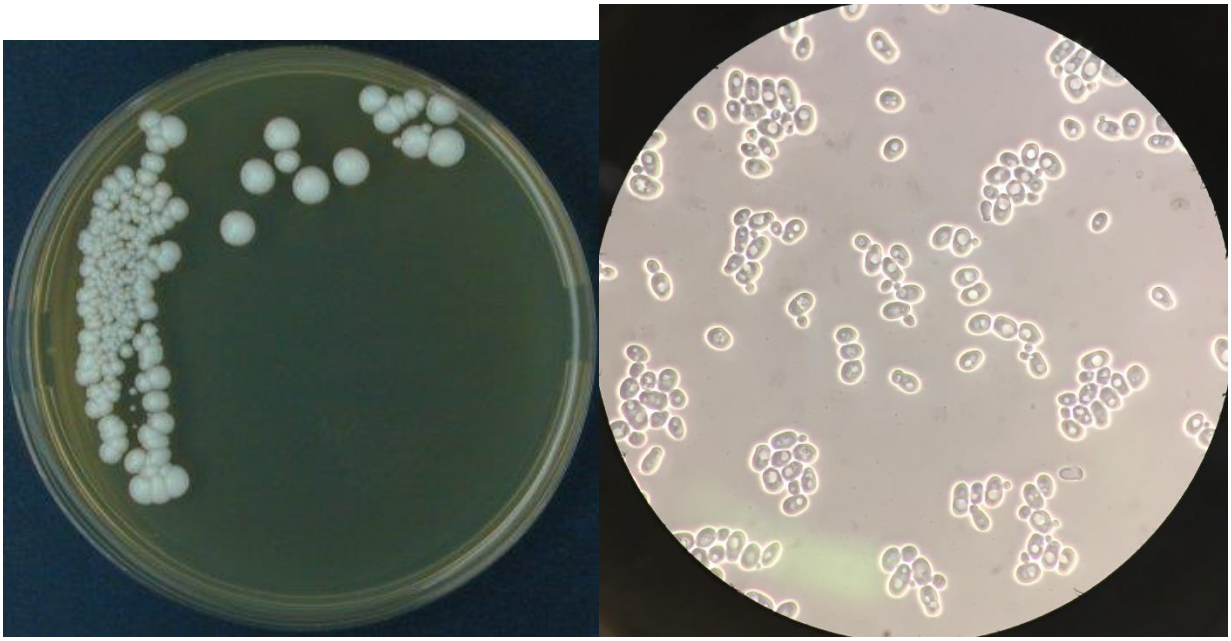
Gram positive yeast and Indian ink positive

العملى الرابع

Saccharomyces cerevisiae

خميرة الخباز و عملية التخمر

***هي من الخمائر الحقيقية وهي من الفطريات الأسكية (الزقية) و هي من أهم الأجناس في الفصيلة السكاروميتية ولها قدرة معينة على تخمر السكريات و يستعمل في صناعة المعجنات وتحول السكاكر البسيطة إلى كحول بتركيز 10-20% و يحتوي على فيتامين (أ) يوجد في رحيق الأزهار و افرازات الأشجار و سطوح الأوراق و الثمار والخبز و التربة و يكون بشكل خلايا فردية وتكون على سطح الطبق بشكل مستعمرات بيضاء اللون كريمية الملمس أو قشدي و تكون الأبواغ الزقية و تتكاثر لاجنسيا بالتبرعم Budding . وتستعمل في صناعة الخبز و المشروبات الكحولية ليس لها تأثير طبي لكن قامت بتأثير مرضي بعد استخدامها كبروبيوتيك و أدت لى تسمم الدم .**



Saccharomyces cerevisiae in microscope and culture

***التخمرFermentation: هي عملية كيميائية يتم من خلالها تحطيم المادة السكرية بواسطة الأنزيمات وذلك للحصول على الطاقة منتجة بذلك كحول ايثيلي و غاز ثاني أكسيد الكربون كنواتج أساسية لعملية التخمر ويسمى التخمر هو التنفس اللاهوائي.**

*** أهم السكريات التي تقوم بتخميرها الخمائر السكريات البسيطة(الجلوكوز و الفركتوز) و الثنائية(السكروز).**

***عملية التخمر بواسطة الخميرة لها دور مهم في صناعة الخبز والمشروبات الكحولية.**

***التخمر في الخبز وميكانيكية التخمر في الخبز:**

تبدأ الخميرة في النشاط بمجرد خلط مكونات الخبز . تبدأ عملية التخمر بالتحلل المائي لنشا الدقيق الى سكر ثنائي (مالتوز) بفعل الأنزيمات الموجودة بالدقيق ومن ثم يقوم انزيم المالتيز المفرز بواسطة الخميرة بتحويل هذا السكر الى جلوكوز في حين يحطم انزيم الزايميز المفرز بواسطة الخميرة سكر الجلوكوز منتجا بذلك غاز ثاني أكسيد الكربون وكحول ايثيلي كنواتج أساسية لعملية التخمر ... ولزيادة سرعة التخمر يتم إضافة السكر إلى الدقيق حيث يعمل انزيم الانفرتيز المفرز من الخميرة على تحويل السكروز المضاف الى الدقيق الى جلكوز و فركتوز وبعد تكون هذه السكريات البسيطه يقوم انزيم الزايميز المفرز من الخميره ايضا بتحويلها الى غاز ثاني اكسيد الكربون وكحول ايثيلي حيث يقوم غاز ثاني اكسيد الكربون الناتج بنفخ الرغيف بصوره جيده أما الكحول فيتطاير أثناء عملية الخبيز في حين تموت الخميرة بفعل درجة الحراره المرتفعة.

***للكشف عن عملية التخمر معمليا :يتم استخدام محلول الخميرة (خميرة + جلوكوز أو سكروز + ماء دافئ 30 م - 45 م (وذلك في غياب الأكسجين) (ظروف لاهوائية)يترك المحلول لفترة لتتم عملية التخمر.**

***خميرة الخبازbaking yeast powder: هو عبارة عن خميرة الخباز الجاهزة المحتوية على *Saccharomyces cerevisiae* بأضافة الماء الدافي لمدة 15 دقيقة حتى تتنشط و يضاف الدقيق (مادة بروتينية تسم الجلوتين و أملاح الأمونيوم والفوسفات لتساعدها على النمو) إليه و السكر حتى تستطع الخميرة تخمير السكر و إنتاج الغاز و الكحول.**

***مسحوق الخبازBaking powder: عبارة عن مخلوط من مواد كيميائية يتصاعد منها الغاز اذا خلطت بالعجينة و أحد محتوياته جزيئين من طرطرات البوتاسيوم الحامضية و بيكربونات الصوديوم وينطلق غاز ثاني أكسيد الكربون عندما تصل إليه الرطوبة .**

***أنزيم الانفرتيز : تفرزه *Saccharomyces cerevisiae* وتقوم بتحليل السكروز الى جلوكوز وفركتوز و يستخدم هذا الأنزيم في صناعة الحلويات و إنتاج العسل الصناعي و السكر المتحول.**

العملي الرابع

Schizosaccharomyces pombi

***هي خمائر من الفطريات الأسكية (الزقية) و هي تتكاثر لا جنسيا بالانشطار الثنائي فقط Binary fission**

***تسمى بخميرة قاع الجرول الخشبي في قاع جرول المخمر للفواكه و كانت أول عزلة لها في قاع الجرول المخمر لهذا تسمى بخميرة النبيذ و تستخدم في صناعة النبيذ و تم عزلها من مولاس السكر و عصير العنب ويستطيع تخمير السكروز.**

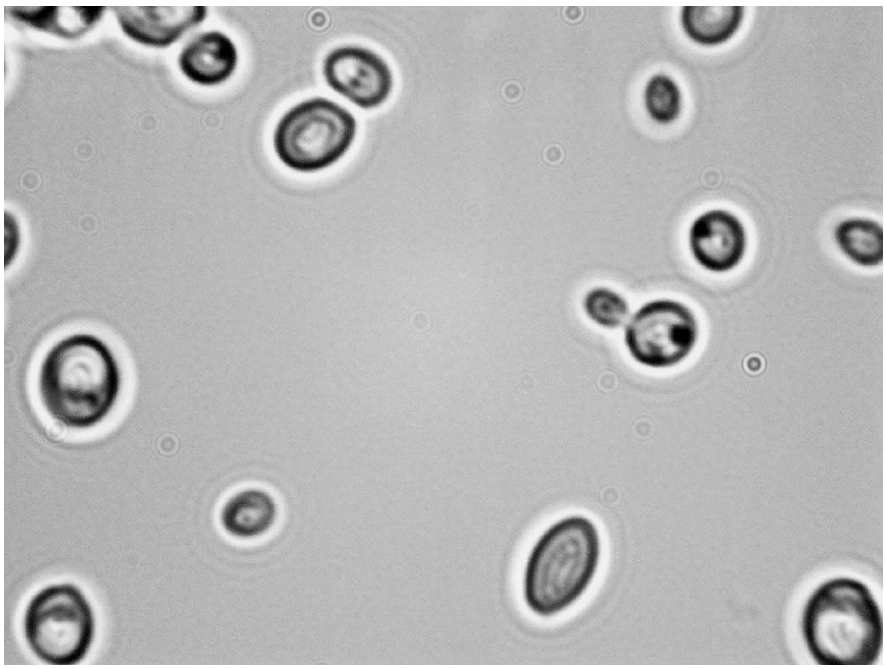
***تستخدم في الأبحاث للعلوم الطبية الحيوية لمعالجة الخمائر المقاومة للمضادات الحيوية.**

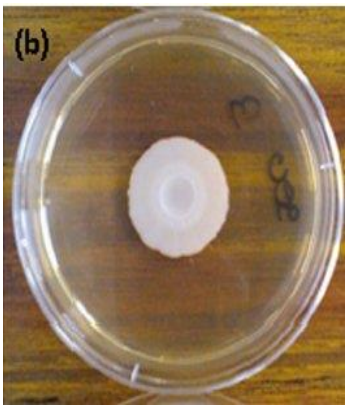
العملي الخامس

Hansenula anomala (Pichia anomala)

***هي خمائر من الفطريات الزقية وتتكاثر لاجنسيا بالتبرعم Budding و تستخدم في صناعة المشروبات الكحولية و تسبب تلف أو خطأ في النبيذ faults in wines وتسبب طعما شبيها بالاستر تكون رائحته مميزة وتكون كريمية الشكل على الطبق في مستعمراتها .**

***مترممة في البيئة الخارجية و توجد في الحليب و الجبن و الزبادي و تعتبر غير ممرضة في البداية و لكنها قامت بعملية تفشي في المستشفى وسميت ب Nosocomial infection للأطفال الرضع و سببت تسمم في الدم Fungemia و اختلال في الرئة و التهاب في عضلة القلب و التهاب في الأمعاء.**





العملي السادس

Rhodotorula mucilaginosa

***هي خمائر تضم تحت الفطريات البازيدية و تتكاثر لاجنسيا و تكون مستعمراتها كريمية الى مخاطية برتقاية اللون و بعض السلالات تكون حمراء اللون لأنها تحتوي على ضبغة لهذا تظهر باللون البرتقالي أو الأحمر و تعيش في الهواء و التربة و الحليب و الماء و عصير الفاكهة.**

***سابقا لم تسجل لها حالة مرضية ولكن بعد ذلك صنفت أنها انتهازيةopportunistic infection و سببت التسسم الدم عن طريق أنابيب القسطرة و التهاب القلب و التهاب السحايا و تسبب الأمراض للحيوان مثل الماعز و الخراف و الحيوانات البحرية و اصابات في جلد الدجاج ولها دور مهم في المعالجة الحيوية للمياه.**

العملي السابع

Candida albicans

***هي خمائر ضمن الفطريات الزقية و هي انتهازية opportunistic pathogen تسبب الكثير من الأمراض لدى النساء في المهبل Vaginal Thrushو التهاب الفمMouth thrush ويسمى المرض بداء المبيضات Candidiasis وتصيب كبار السن و الذين لديهم ضعف في الجهاز المناعيimmunocompromised و تسبب التهاب المسالك البولية وتعيش طبيعيا في الفم و الجهاز الهضمي و تنتج الأبواغ الباليستية و الكلاميدية و تكوين هيفات كاذبة في الظروف الصعبة على بيئة corn meal agar ويتم تشخيصها بعدة طرق:**

1-بيئة Chromagar candida: هي بيئة تفريقية تستخدم للتفريق بين أنواع الكانديدا بواسطة اللون .

مبدأ وتفسير CHROMagar Candida أفاد بيري وميلر أن Candida albicans تنتج إنزيم b -N-acetyl-galactosaminidase ووفقًا لـ Rousselle et al ، فإن دمج ركائز hexosaminidase الكروموجينية أو الفلورية في وسط النمو يساعد في تحديد عزلات C. HiCrome Candida التفاضلي Agar هو وسيط انتقائي وتفاضلي ، مما يسهل العزل السريع للخمائر من المزارع المختلطة ويسمح بالتمييز بين أنواع المبيضات وهي C. albicans و C. krusei و C. Tropicalis و C.glabrata . يتم الحصول على النتائج على هذا الوسيط في غضون 48 ساعة وهي مفيدة في التحديد السريع والافتراضي للخمائر الشائعة في مختبر علم الأحياء الدقيقة وعلم الأحياء الدقيقة السريرية. يوفر الببتون الخاص وخلاصة الخميرة مركبات نيتروجينية كربونية ومغذيات نمو أساسية أخرى.محلول الفوسفات يجعل البيئة غنية . الكلورامفينيكول يثبط الفلورا البكتيرية المصاحبة.

تظهر C. albicans على شكل مستعمرات ناعمة ذات لون أخضر فاتح.

وتظهر C. Tropicalis على شكل مستعمرات مرتفعة ملونة باللون الأزرق إلى الأزرق المعدني.

تظهر مستعمرات C. glabrata على شكل كريم إلى مستعمرات بيضاء ناعمة.

بينما تظهر مستعمراتC. krusei على شكل مستعمرات أرجوانية ضبابية.

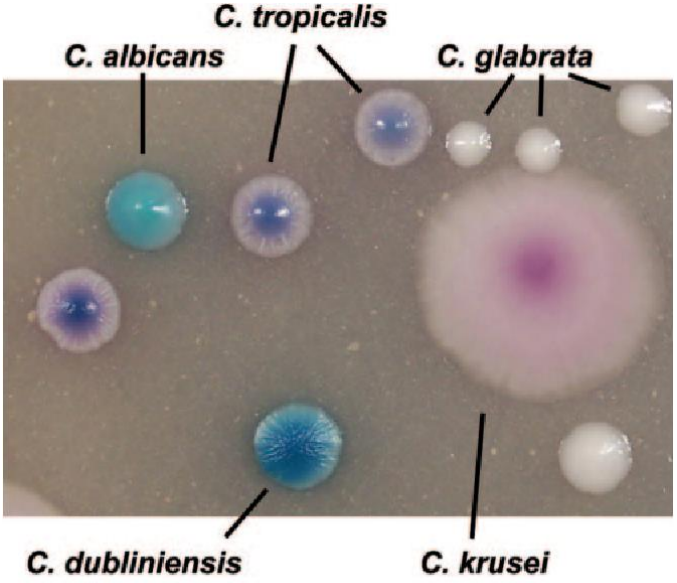
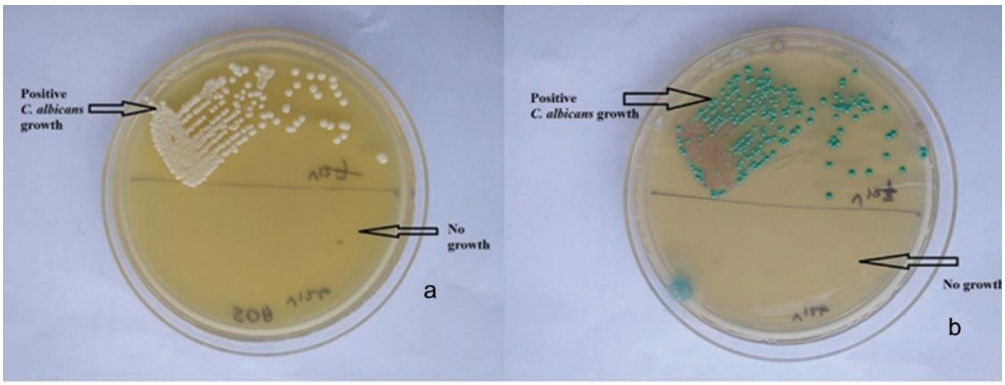
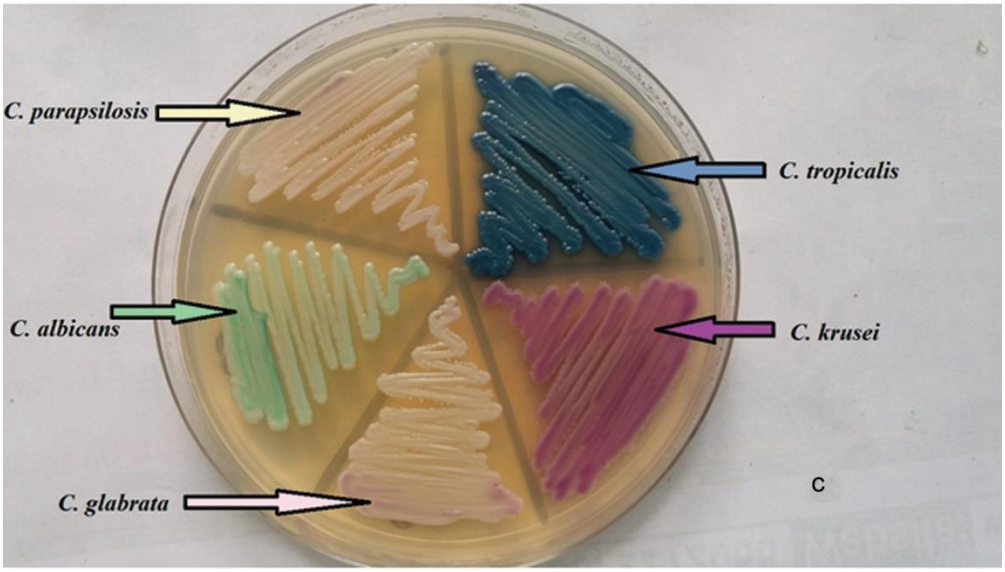


FIG. 1. Colonies of different species of *Candida* after growing for



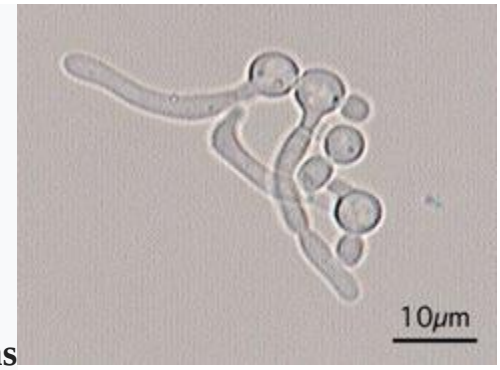


هنا تظهر قراءة النائج بالنسبة لبيئة Chromagar

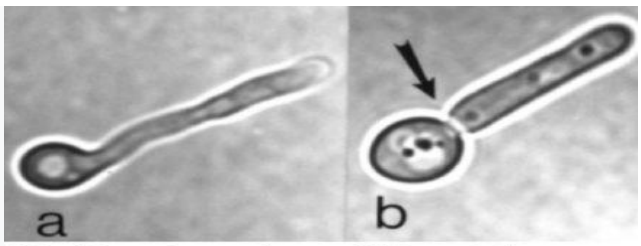
2-اختبار أنبوب الانبات الجرثومي Germ tube test: هو اختبار يستخدم للتفريق بين *Candida albicans and other candida*. وأنبوب الانبات عبارة عن هيفات كاذبة

الاختبار يكون داخل أنبوب سيرم human serum و السيروم هو عبارة عن السائل المفصول من الدم بدون مواد تجلط و يتم تلقيح الخميرة المراد اختبارها داخل الأنبوب و تحضينها على درجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة ساعتين و قراءة النتائج بواسطة الwet prep slide و تكون النتيجة لدى *Candida albicans* كالتالي:

positive candida albicans



b)false positive

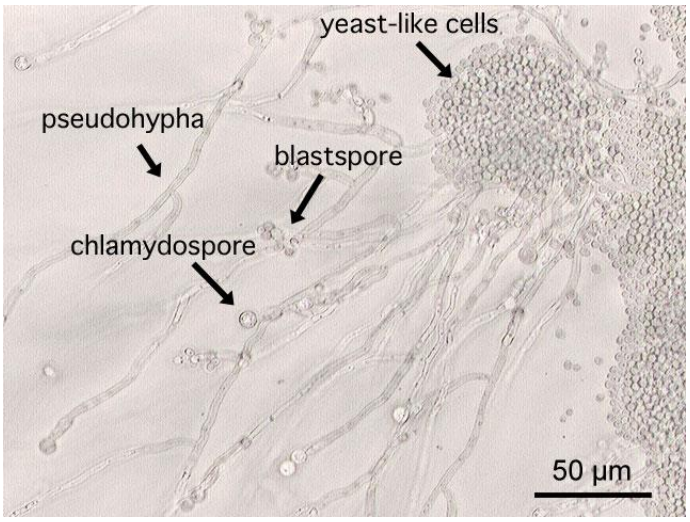


a) *C. albicans:* Germ tube ormation

(b) *C. tropicalis*: blastoconidial germinatio with constriction

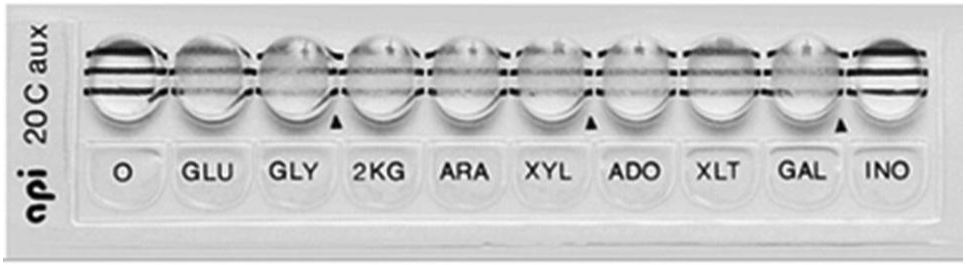
anual of Clinical Microbiology, 11th Edition, ASM Press, Washington, DC

3-corn meal agar نزرعها على هذه البيئة و يتم فحصها مجهريا بعد التحضين لمدة 24-48ساعة و قرأ النتائج بأنتاجها للهيفات الكاذبة و الأبواغ الكلاميدية و البلاستية :



4-اختبار تخمر السكريات Carbohydrate assimilation test API 20 C:

اختبار يتم فيه استخدام الخمائر لتخمر السكريات .



Species	Xyl	Lac	Suc	Mal	Mel	Cel	Tre
C. albicans	+	+	+	_	+	+	+
C. tropicalis	+	_	+	+	_	+	+
C. glabarata	+	_	_	_	_	_	+
C. parapsilosis	+	_	+	+	_	_	+
C. krusei	+	_	_	_	_	_	_
C. dublinensis	+	+	+	_	+	+	+

Candida species Identification

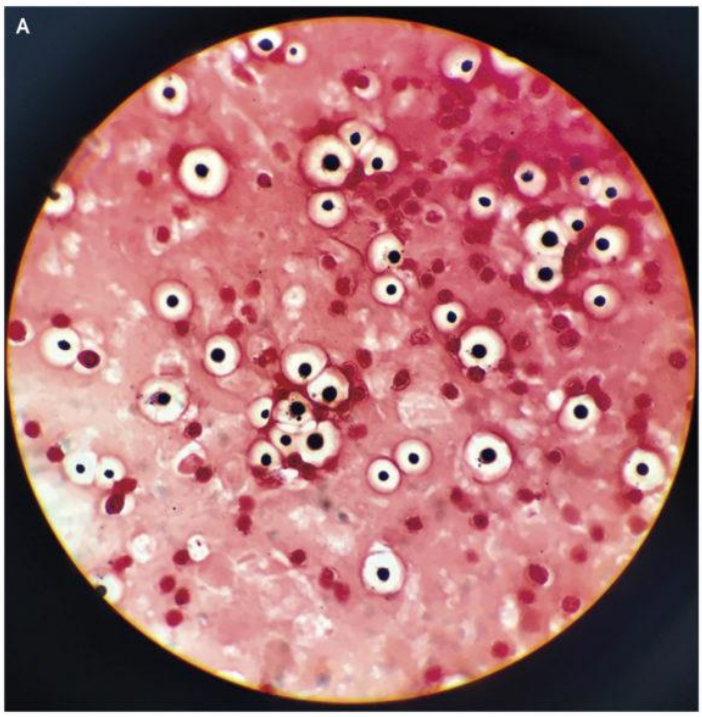
		C. albicans	C. dubliniensis	C. glabrata	C. krusei	C. kefyr	C. parapsilosis	C. tropicalis	C. guilliermondii	C. famata	C. lipolytica
Chlamydospore		+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Germ tube		+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Pellicle On broth					+						+
Urease					+						+
Fermentation	Glu	F	F	F	F	F	F	F	F	W	-
	Mal	F		-	-	-	-	F	-	-	-
	Suc	-	-	-	-	F	-	F	F	W	-
	Lac	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-
	Gal	F	F	-	-	F	-	F	F	-	-
	Tre	F	F	F	-	-	-	F	F	W	-
Assimilation	Glu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Mal	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
	Suc	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
	Lac	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
	Tre	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-

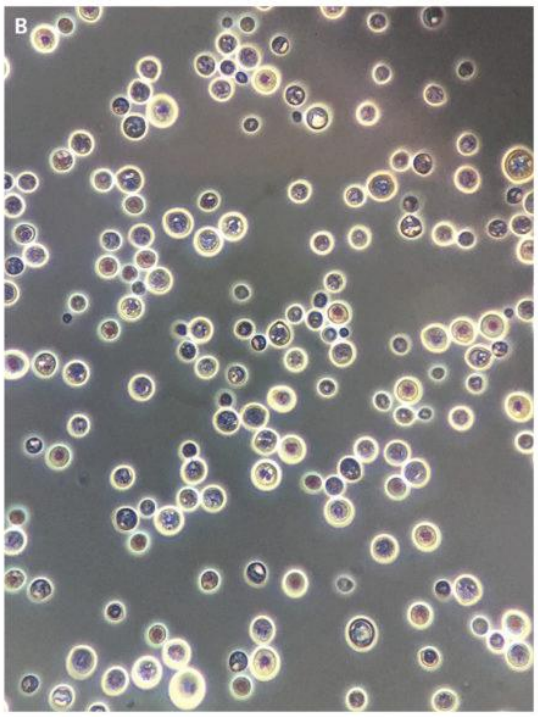
ويتم تشخيصها بال ELISA and PCR.

العملى الثامن

Cryptococcus neoformans

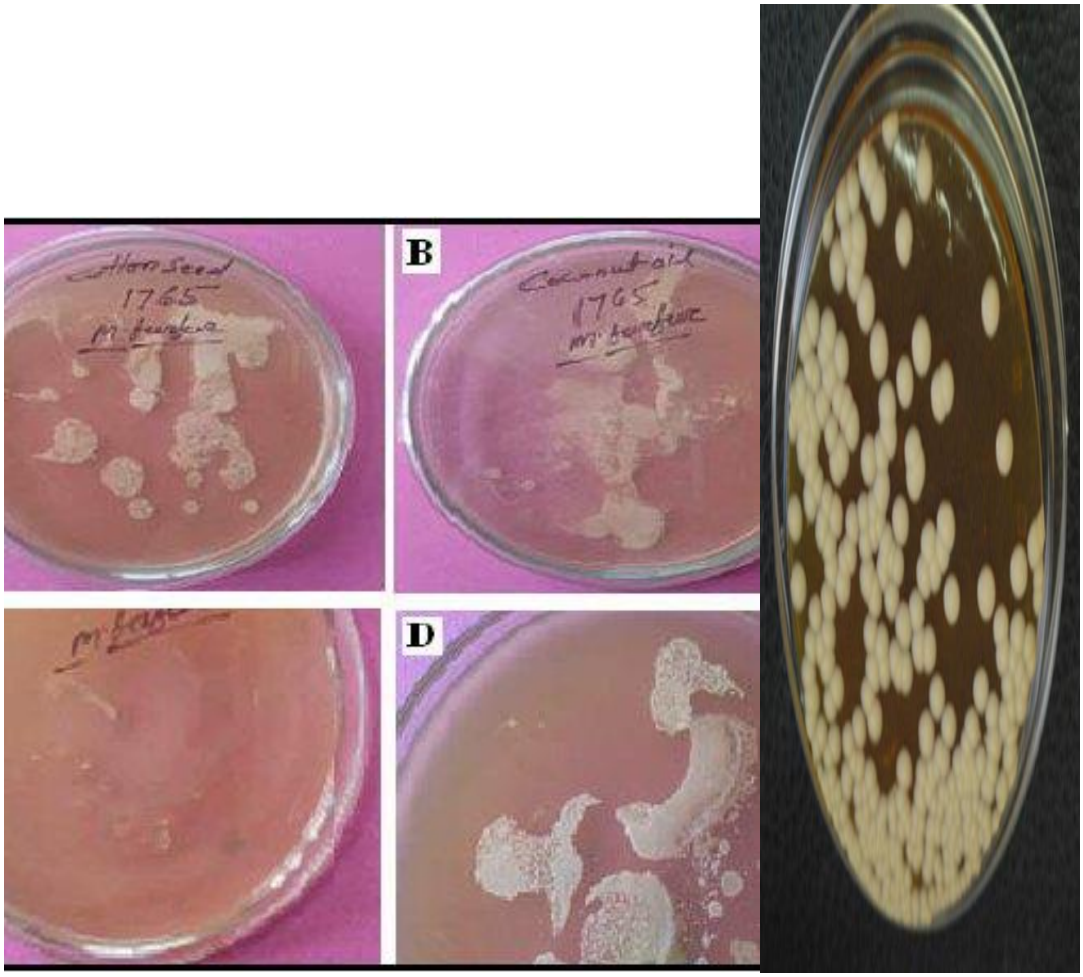
*هي من الفطريات البازيدية و هي من الخمائر شديدة الامراضية و تسبب مرض الالتهاب الرئوي الحاد و التهاب السحايا meningitidis يتم فحصها عن طريق أخذ عينة من سائل الحبل الشوكي CSF ويكون التعرف عليها مجهريا عن طريق الصبغة السالبة وهي الحبر الهندي Indian ink وتكون مستعمراتها كريمية مخاطية لانها تحتوي على العلبة capsule وهي سبب العامل الامراي و ظهور هالة حول الخلية الواحدة في الصبغةونستخدم بيئة Bird seed agar .

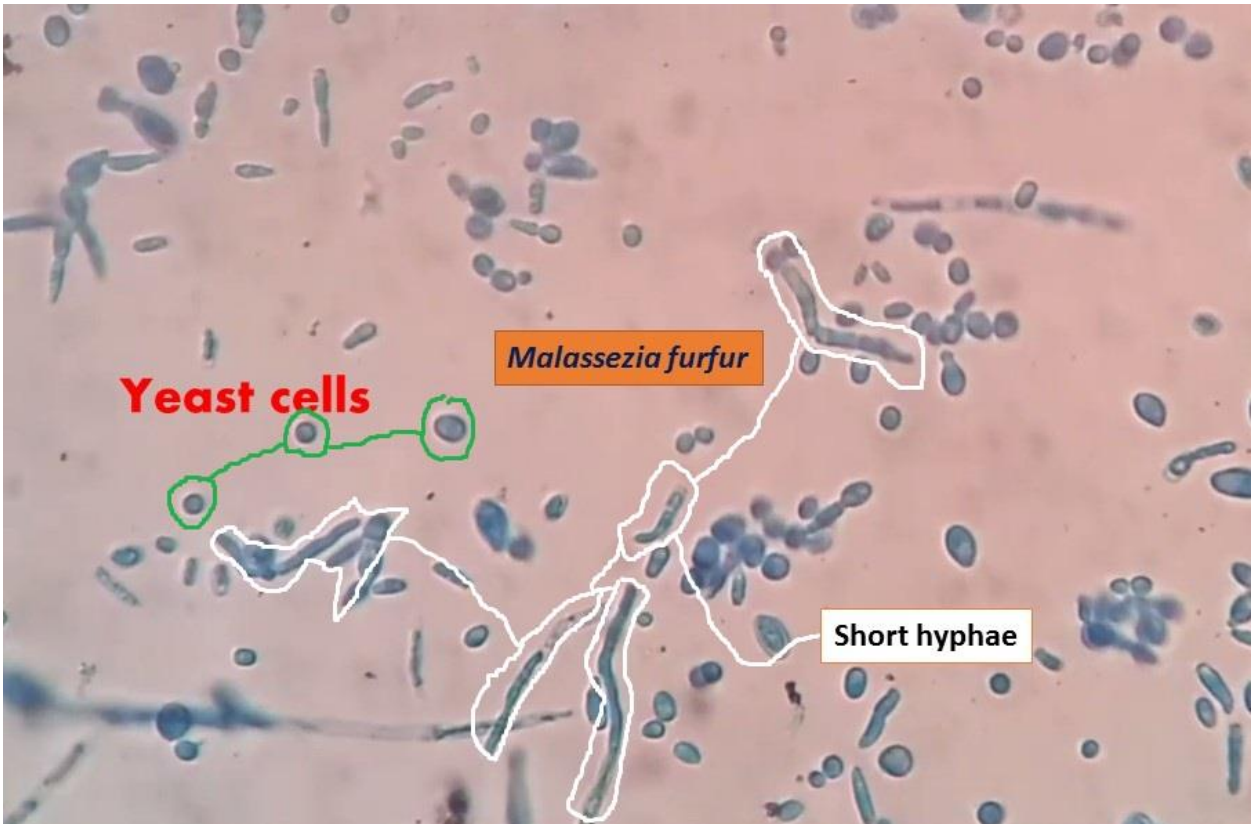


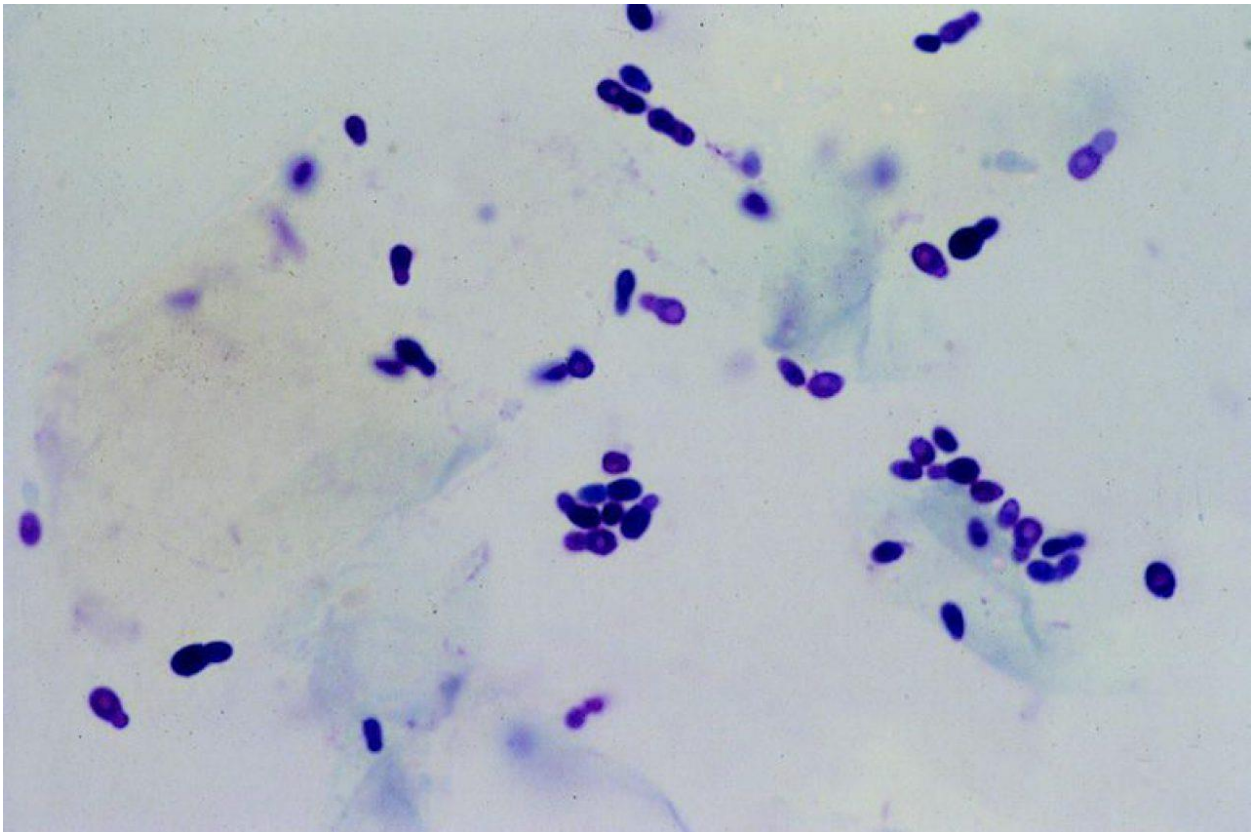


Malessezia sp.

***هي من ضمن الفطريات البازيدية و هي متعايشة مع الانسان وتعيش في جلد الانسان و شعر الانسان وهي انتهازية وتسبب مرض جلدي للإنسان وهي السبب الأكثر شيوعا للقشرة في الشعر والتهاب الجلد الدهني و تحب الدهون في نموها لذا عند عزلها يفضل استخدام الزيوت الحيوانية و النباتية لنموها و أشهر مثال عليها *Malessezia furfur* عند عزلها تتحضن عند 32 درجة مئوية 5أيام.**

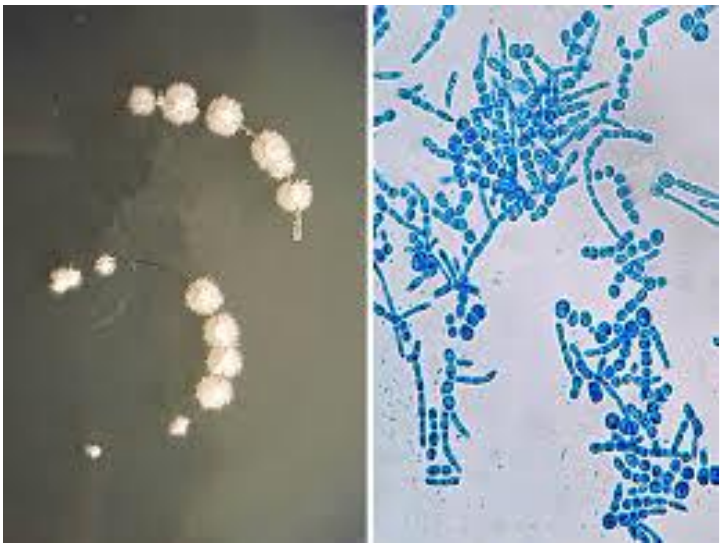



Yeast cells
Malassezia furfur
Short hyphae



Trichsporon sp.

هي من الفطريات البازيدية التي تتكاثر لاجنسيا توجد في التربة و تعيش طبيعيا في الجلد و هي انتهازية و تسبب داء المشعرات White Piedra و أشهر نوع هو Trichosporon beigelii



Geotrichum sp.

هي من الفطريات الأسكية (الزقية) توجد في الماء و الهواء و التربة و مياه الصرف الصحي وتعيش طبيعيا في البراز و البلغم و أشهر مثال لها Geotrichum candidum تستعمل في صناعة قشرة الجبن و الحليب في الماعز و تسبب الأمراض لضعيفي المناعة ومرضى السرطان و سرطان الدم.