

Diplomarbeit

***Aspergillus niger* in Otomykosen –
Who Are the Men in Black in Otomycosis?**

eingereicht von

Marcel Schöpfer

Mat.Nr.: 0412267

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr.med.univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

Begutachter/in:

Ass.-Prof. Priv.-Doz. Ing. Mag. Dr. Walter Buzina, Institut für Hygiene,
Mikrobiologie und Umweltmedizin

Univ. Prof. Dr. Doris Lang-Loidolt, Universitätsklinik für HNO Graz

Graz, Juli 2011

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende wissenschaftliche Arbeit selbstständig angefertigt und die mit ihr unmittelbar verbundenen Tätigkeiten selbst erbracht habe. Ich erkläre weiters, dass ich keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe sämtliche Autoren- und Vertragsrechte der verwendeten Literaturquellen beachtet, nur die angegebenen Quellen benutzt und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Die während des Arbeitsvorganges gewährte Unterstützung einschließlich signifikanter Betreuungshinweise ist vollständig angegeben.

Diese Arbeit wurde in gedruckter und elektronischer Form abgegeben und ist noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt worden.

Graz, Juli 2011

(Marcel Schöpfer)

Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mir geholfen haben diese Arbeit zu vollbringen:

Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin und den Universitätskliniken für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde Graz und Innsbruck für die Bereitstellung der benötigten Geräte und Materialien.

Ass.-Prof. Priv.-Doz. Ing. Mag. Dr. Walter Buzina und Univ.-Prof. Dr. Doris Lang-Loidolt für die wissenschaftliche Betreuung.

Allen Kolleginnen und Kollegen, insbesondere Bettina Heiling, für die praktische Unterstützung.

Mag. Peter Tschuffer für die Korrektur dieser Arbeit.

Meinem Bruder Patrick für die graphischen und technischen Hilfestellungen.

Meinen liebevollen Eltern, Werner und Elfriede, für die geduldige Begleitung und Unterstützung im gesamten Studium der Humanmedizin und der Ermöglichung eines wichtigen und unersetzbaren Lebensabschnitts.

Meinem Patenonkel, Dr. Helmut Schöpfer, ohne den ich niemals Medizin studiert hätte.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Historisches	1
1.2 Was sind Otomykosen?	4
1.3 Anatomie und Histologie des äußeren Gehörgangs	6
1.4 Biologie der Pilze	9
1.4.1 Klassifikation und Nomenklatur	9
1.4.2 D-H-S-System: Einteilung medizinisch wichtiger Pilze	11
1.4.3 Aufbau der Pilzzelle.....	12
1.4.4 Physiologie	14
1.4.5 Lebensbedingungen und Lebensweise medizinisch wichtiger Pilze.....	15
1.4.6 Mykopathien	17
1.5 Ziel der Arbeit.....	18
2. Material und Methoden.....	20
2.1 Arbeitsschritte	20
2.2 Probenmaterialien	20
2.3 Nährmedien	21
2.4 Molekularbiologische Identifikation	21
2.4.1 DNA-Isolation	22
2.4.2 PCR.....	22
2.4.3 DNA-Sequenzierung.....	25
2.4.4 Sequenzanalyse und Datenbank.....	26
3. Ergebnisse.....	27
3.1 Morphologie	27
3.2 Molekularbiologische Ergebnisse.....	31
3.2.1 DNA-Isolation und PCR.....	32
3.2.2 DNA-Sequenzierung.....	33
3.3 Krankenakten	57
3.4 Statistische Auswertung der demographischen Daten aller positiven Pilzbefunde aus dem Ohr (2006-2010)	63
4. Diskussion	67
4.1 Biologische Diskussion	67
4.2 Klinische Diskussion	69
5. Zusammenfassung	74
6. Abstract	76
7. Literatur	77
Anhang	81

Abkürzungen

A. d.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
bp	Basenpaar
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DNA	Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Eppi	1,5ml Reaktionsgefäß
EtBr	Ethidiumbromid
ETS	external transcribed spacer
ITS	internal transcribed spacer
MEA	Malzextraktagar
min	Minuten
PCR	polymerase chain reaction
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute
rcf	relative centrifugal force
RT	Raumtemperatur
Fa.	Firma
A.	<i>Aspergillus</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
GG	Gehörgang
re.	rechts
li.	links
RNS	Ribonukleinsäure
bt2a/b	β-Tubulin-Primer
o. B.	ohne Befund
sp./spp.	Species/Several species

1. Einleitung

1.1 Historisches¹

Die erste Beobachtung über das Vorkommen von Aspergillen im Ohr wurde 1844 von Dr. Mayer in Bonn gemacht. Aus dem Gehörgang eines achtjährigen Mädchens isolierte er Pilzmassen, welche einem *Aspergillus fumigatus* zugeschrieben wurden. In der zweiten Publikation über Ohrpilze beschrieb Pacini 1851 den ersten Fall von einem *Aspergillus niger*.

Dr. Kramer beschrieb 1859 in Zürich ausführlich einen im menschlichen Ohr gefundenen *Aspergillus niger*, den er *Sterigmatocystis antacustica* bezeichnete.

Im Jahre 1868 erschien die erste bedeutende Arbeit über Otomykosen von Wreden: *Sur une nouvelle forme de maladie*. Er nannte die Krankheit *Myringomycosis aspergillina*. Als Hauptbedingungen machte er Sporen aus der Luft und eine mikroskopisch vorgeschädigte Oberhaut verantwortlich. Wreden beobachtete Trommelfellperforationen, Pilze in der Paukenhöhle, betrachtete Aspergillen als echte Parasiten und empfahl neben unterchlorigen Lösungen Chlorwasser, das Einträufeln von Öl und Einbringen von Speck. Alkohol hielt er für unwirksam.

1868 sprach sich Weber-Liel dafür aus, dass das Wachstum der Ohraspergillen anfänglich saprophytisch, dann parasitär werdend sei. Weiters meinte er, dass anormale Sekretionsverhältnisse des äußeren Gehörgangs einen günstigen Boden für die Conidien liefern. Steudener widerlegte 1870 die Behauptung über die parasitäre Natur der Ohrpilze, letztere seien vielmehr Saprophyten.

Wreden war 1873 nach wie vor von der parasitären Erkrankungsform überzeugt. Eitrige Ohrenentzündungen schlossen Pilzwucherungen aus, abgelaufene begünstigten sie.

Bezold führte ebenso im Jahre 1873 in seinem Buch „Zur Entstehung von Pilzbildung im Ohr“ Hauptbedingungen wie Anwesenheit von Öl im Gehörgang an und hält die Otomykose als saprophytär beginnend, dann parasitär werdend. Vor allem deshalb keine reine saprophytäre Besiedelung, weil ein festes Anhaften, die Schwellung, Rötung, die Pilzdurchsetzung der abgestoßenen Häute, die immer wieder auftretenden

Rezidive trotz sorgfältiger Reinigung eher für ein parasitäres Wachstum sprachen. Zwei Jahre später (1875) empfiehlt Bezold „die Salicylsäure in der Ohrenheilkunde“. Burnett beschrieb 1879 einen Pfropf mit Ähnlichkeit zu nassem Zeitungspapier. Ekzeme sollen nicht mit Ölen behandelt werden, da diese einen Nährboden für Aspergillen bieten. Mechanische Reizung des Meatus, Unreinlichkeit, Entfernung des Cerumenüberzugs durch Herauskratzen, Ausseifen, Baden, ferner Übertragung der Affektion von Ohr zu Ohr mittels chirurgischer Instrumente; Watte machte er für eine Otomykose verantwortlich.

1880 ging Bezold von einer Ohrmykosenprävalenz von 1:65 aus. Er referierte über 48 Fälle, 19 davon waren symptomlos mit zufälligem Pilzbefund, in den übrigen 29 Fällen war die Otomykose mit Entzündungsvorgängen kompliziert.

Eines der wertvollsten Werke über Otomykosen wurde 1883 von Siebenmann veröffentlicht. Sein Buch „Die Fadenpilze – *A. flavus*, *niger* und *fumigatus*, *Eurotium repens* u. *A. glaucus* und ihre Beziehungen zur Otomycosis aspergillina“ lieferte wertvolle Informationen über die Pilz assoziierten physiologischen und pathophysiologischen Vorgänge im äußeren Gehörgang, welche sich auf seine durchgeführten Versuche stützten, und bot zusätzlich einen umfassenden Überblick sowie Ergänzungen der vor ihm veröffentlichten Literatur.

Er ging bereits vom Vorhandensein einer primären Grunderkrankung, wie einer Mittelohrentzündung, als Ursache für eine Otomykose aus. Denn zwei von den drei Hauptbedingungen Siebenmanns zum Entstehen und Gedeihen einer Aspergillusvegetation, wie ein freier Lufteintritt und Wärme (20-40°C) waren im Gehörgang bereits vorhanden. Die dritte Hauptbedingung, das notwendige Substrat (Nährboden), kann im normalen Gehörgang nur in besonderen Fällen („anormale Zustände des Ohres“) zu finden sein.

Voraussetzung wäre die Absonderung einer über mehrere Tage nicht faulenden, bakterienfreien, dünnen und freien Serumschicht (seröses Sekret), da ein begleitender dünn seröser Ausfluss in seinen Otomykosenfällen häufig vorkam. Als günstigste und erste mögliche Nahrungsquelle gilt für ihn das Serum. Eiter wirke dem Wachstum entgegen (schnell zersetzend, alkalische Reaktion). Dem Cerumen werden ebenso pilzfeindliche Eigenschaften zugeschrieben.

Er beschrieb einen Circulus vitiosus: *Aspergillus* steigert die Entzündung und diese liefert durch Produktion von Serum dem *Aspergillus* wieder kräftigere Nahrung.

Pilzbegünstigend ist alles, was eine eitrig-eitrige Otorrhoe in eine seröse umwandeln kann, die Masse des Sekrets vermindert und dessen Zersetzung aufhält. Siebenmann erörterte die Behandlung mit Adstringentien und Desinfizientien und warnt vor dem Gebrauch von Tannin- Zinksolutinen und Glycerin. Öl wird nicht als Nahrungsquelle gesehen, sondern scheint viel mehr die fermentative Wirkung des *Aspergillus* zu erhöhen.

Weiters war bekannt, dass akute Dermatiden durch Berührung mit Öl, Lösungen und Fette entstehen können, wenn sie schon bestehend waren aber auch dadurch verschlimmert werden konnten. Die Epidermis, so meinte er, könnte dann durch diese Medikamente viel leichter exfolieren und dadurch eher eine seröse Sekretion eintreten.

Zuckergehalt des Blutserums hält er noch für keinen wesentlichen Belang, da die Pilze auf zuckerhaltiger Platte nicht besser gewachsen sind.

Den Lieblingssitz der Pilzmembran beschrieb er als das Trommelfell und das innere Drittel des Meatus acusticus externus. Die *Aspergillen* waren für Siebenmann im Corium (*A. niger*, *A. flavus*) und der Epidermis (*A. fumigatus*) aufzufinden.

Er konnte keine Invasion der gesunden Epidermis auf Kochscher Platte beobachten (Mycel greift nicht durch die Epidermis hindurch in die Tiefe), war sich sicher, dass keine Invasion stattfindet unabhängig, ob parasitär wachsend oder nicht. Sprach vom Festsetzen des Pilzes in der Haut.

Als Therapie der Otomykose empfahl er Salicylalkohol 4%ig in Form von Ohrbädern.

1.2 Was sind Otomykosen?

Der Begriff Otomykose wird hauptsächlich verwendet, um pilzbedingte superfizielle Infektionen des äußeren Ohres, inklusive der Ohrmuschel, des äußeren Gehörgangs, des Trommelfells und des Mittelohres und gegebenenfalls postoperativer Höhlen der Ohren zu beschreiben.^{2,42} Die bösartige, invasive, nekrotisierende Otitis externa ist eine Infektion des äußeren Gehörgangs, welche in der Lage ist, in die Schädelbasis und die Zellen des Mastoids einzudringen. Andere Synonyme sind pilzbedingte Otitis externa, Pilzotitis, Otitis externa maligna oder infektiöse Otitis externa.²

Die Arten, die eine Pilzinfektion auslösen können, umfassen Schimmelpilze, Sprosspilze und gelegentlich Dermatophyten. Aspergillen und *Candida Species* werden in der Literatur am häufigsten als Auslöser einer pilzbedingten Otitis externa erwähnt. Andere Gattungen wie *Mucor*, *Fusarium*, *Scedosporium*, *Hendersonula*, *Rhodotorula* und *Cryptococcus* dafür sehr selten.^{2,3-6}

Im gesunden Gehörgang sind Schimmelpilze und Sprosspilze auch Teil der normalen Flora. Hingegen gehören die hier isolierten Pilze zum Großteil zur *Penicillium* spp. und der Anteil an *Aspergillus* spp. und *Candida* spp. ist in gesunden Gehörgängen sehr niedrig.^{2,7}

Vorherrschende Schimmelpilze sind *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*. *Candida parapsilosis* ist der vorherrschende Sprosspilz. Diese Vorherrschaft von thermophilen Aspergillen und *Candida* spp. ist eng verbunden mit dem entzündlichen Prozess im Ohr.²

Trichophyton spp, sehr selten *Microsporum* spp, und *Epidermophyton floccosum* können als Dermatophyten des äußeren Ohres im Gehörgang auftauchen.^{2,8-11}

Das Immunsystem spielt eine zentrale Rolle für die Heilung und den Ablauf einer Otomykose.²

Immunkompetente Patienten zeigen für gewöhnlich superfizielle Pilzinfektionen und eine chronische Kolonisation des Gehörgangsepithels und/oder eines Cholesteatom. Pilze lösen eine akute und chronische, nicht invasive (Kolonisation) Otitis ex-

terna aus. Der äußere Gehörgang ist am öftesten betroffen. Das Trommelfell und der Mittelohrraum sind selten involviert.^{2,12-16}

Einer pilzbedingten Otitis externa gehen generell verschiedenste prädisponierende Faktoren voraus, wodurch der Pilz den nötigen Nährboden bekommt.

Ursachen für eine Besiedelung mit Pilzen sind Erkrankungen wie eine chronische Otitis media (mit oder ohne Cholesteatom) mit Perforation des Trommelfells und Otorrhoe, akute bakterielle Otitis media mit Otorrhoe, Gehörgangsexostosen und Gehörgangsekzemen. Primär scheint eine ständige Sekretion bei Patienten mit Otitis media chronica die Gehörgangshaut zu mazerieren, die protektive Funktion von Cerumen und der Haut zu zerstören und eine Kolonisation von Pilzen im Ohr zu begünstigen. Aber auch Traumata nach Anwendung von Wattestäbchen, Hörgeräten oder Fingernägeln führen zu einer Irritation der Haut des Gehörgangs und zu einer Zerstörung der schützenden Barriere der Haut und des Cerumens.²

Zusätzlich scheinen Faktoren, wie eine vorangegangene Behandlung mit Antibiotika und/oder Steroiden, erhöhte Luftfeuchtigkeit, Hitze, Schwimmen in öffentlichen Schwimmbädern und sogar das Tragen traditioneller Kopfbekleidung, eine Rolle in der Kolonisation von Pilzen zu spielen.^{2,3,17,19-31}



Abbildung 1: Otomykose durch Aspergillus niger

Die Betroffenen berichten zumeist von Ohrenscherzen, Juckreiz, Sekretion und Hörverlust. Hinzu können sich weißer oder farbloser Ausfluss mit Perforation des Trommelfells, Ödem, Erythem des Gehörgangsepithels und des Trommelfells und weiße, wollähnliche oder schmierige Debris gesellen.^{2,17,18}

Eine durch *Aspergillus niger* ausgelöste Otomykose kann zusätzlich schwarze, bräunliche oder grauschwarze Debris/Massen/Conidophoren zeigen.^{2,24}

Im Normalfall bleibt die „Infektion“ eine superfizielle Infektion^{2,28,29} und ist auf die Haut des Gehörgangs bzw. die Schleimhaut des Mittelohrraums limitiert.³

Immunkompetente Personen werden saprophytär besiedelt.^{2,3} Eine generalisierte Infektion mit Schimmelpilzen kann im Gegensatz zu Bakterien und Hefepilzen nur möglich sein, wenn das Trommelfell perforiert ist. Doch selbst wenn diese Situation bei einem Immunkompetenten längerfristig auftritt, kommt eine Infektion sehr selten zustande.²

Eine maligne Otitis externa kann sich vor allem bei Patienten entwickeln, die unter Diabetes mellitus leiden und bei Patienten unter Immunsuppression.^{2,62} Neben *Pseudomonas aeruginosa*, dem Haupterreger dieser Erkrankung, sind auch Pilze in der Lage solch ein klinisches Bild auszulösen.³⁶

Invasive Formen einer Otomykose können sich im Mittelohr, seltener im Innenohr und der Schädelbasis entwickeln. Dies kann eine Meningitis, eine Invasion der Schleimhautzellen des Mastoids (Mastoiditis) oder Osteolyse zur Folge haben.² Der gerötete Gehörgangskanal zeigt klinische Zeichen einer pilzbedingten malignen Otitis externa.³²⁻³⁹ Diese Patienten leiden unter intensiven Ohrenscherzen, permanenter Sekretion aus dem Ohr, Hörverlust und Übelkeit. Eine progressive Verschlechterung kann zu einer Facialisparese, Gleichgewichtsstörungen und Taubheit führen.^{2,22}

1.3 Anatomie und Histologie des äußeren Gehörgangs⁴⁰

Der äußere Gehörgang, Meatus acusticus externus, zählt anatomisch zum Außenohr (Auris externa) und ist ein wesentlicher Bestandteil des Aufnahme- und Leitungsgangs für die Schallwellen zum Trommelfell.

Haut der Ohrmuschel

Sie ist dünn und fettarm. Sie enthält Schweiß- und Talgdrüsen und ist besonders an der Außenfläche fest mit dem Perichondrium des Knorpelgerüsts verbunden. Am Eingang zum äußeren Gehörgang finden wir Schutzhaare (Tragi), besonders bei älteren Menschen.

Äußerer Gehörgang (Meatus acusticus externus)

Der Meatus acusticus externus, ein ca. 3,5 cm langer, s-förmiger Gang zum Trommelfell, verstärkt durch seine Form und sein Resonanzverhalten die von der Ohrmuschel kommenden Luftschwingungen in den Frequenzen der menschlichen Sprache. Beim Erwachsenen besteht er im lateralen Drittel aus Knorpel, in den medialen zwei Dritteln aus Knochen. Im Alter von fünf bis sechs Jahren sind beide Teile gleich lang. Beim einjährigen Kind ist nur ein Drittel knöchern.

Der knorpelige äußere Gehörgang, Meatus acusticus externus cartilagineus, ist eine Fortsetzung des elastischen Ohrmuschelknorpels. Durch derbes Bindegewebe ist er mit dem knöchernen Teil des Ganges verbunden und hat die Form einer verschlossenen Rinne.

Der knöcherne äußere Gehörgang, Meatus acusticus externus osseus, hat im Querschnitt die Form einer Ellipse, deren Längsachse von hinten oben nach vorne unten verläuft.

Topographie/Wände

Boden/Vorderwand werden durch die Pars tympanica ossis temporalis gebildet. Kaudal des Bodens liegen Ohrspeicheldrüse und M. sternocleidomastoideus. Die dünne Vorderwand liegt der Kiefergelenkpfanne (Fossa mandibularis) an. Die Hinterwand wird von der Pars petrosa (Ossis temporalis) gebildet und das Dach stellt die Pars squamosa des Schläfenbeins (Os temporale) dar.

Haut

Sie ist eine Fortsetzung der äußeren Haut und besitzt wie diese ein geschichtetes verhorntes Plattenepithel, Talgdrüsen und Haare, die gegen den knöchernen Teil spärlicher werden und schließlich fehlen. Ohrschmalzdrüsen (Glandulae ceruminosae et sebaceae) sind großlumige, apokrine, tubulöse Knäueldrüsen, liegen in der Subcutis, münden bei Kindern in die Haarbalglichtung, bei Erwachsenen neben den Haarbälgen, produzieren Talg, den Hauptbestandteil des Ohrenschmalzes (Cerumen), das zusätzlich abgeschilferte Epidermisschuppen, Bitterstoffe und Pigmente enthält. Cerumen hat die Aufgabe, kleine Fremdkörper zum Abtransport einzuhüllen, es ist also kein Schmutz, der ständig entfernt werden müsste.

Trommelfell (Membrana tympanica)

Das Trommelfell ist eine sehnige Haut zwischen äußerem Gehörgang und Paukenhöhle mit dreischichtigem Bau, sie ist die Grenze zwischen äußerem und mittlerem Ohr.

1.4 Biologie der Pilze^{41,42}

1.4.1 Klassifikation und Nomenklatur

Pilze sind heterotrophe, aerobe, niedere Eukaryonten, welche sich durch Ausscheiden von Enzymen und Aufnahme gelöster Substanzen ernähren.

Die wissenschaftlich exakte Einteilung und Benennung von Pilzen erfolgt nach Regeln der Botanik. Sie bilden neben Tieren und Pflanzen ein eigenständiges Reich (Fungi), zu dem sowohl Einzeller als auch Vielzeller gehören. Sie sind enger mit den Tieren als mit den Pflanzen verwandt.

Echte Pilze (Eumyozeten) sind solche, die Chitin in ihrer Zellwand haben. Die human- und tierpathogenen Pilze gehören ausschließlich zu den echten Pilzen.

Zur Einteilung der echten Pilze dient die Art der Fortpflanzung, die in der Bildung sexueller (teleomorph) und asexueller (anamorph) Vermehrungsformen (Sporen) und Fruchtkörper sichtbar wird.

Anhand morphologischer Kriterien der geschlechtlichen (teleomorphen) Formen, wie beispielsweise das Basidium (Ständer) oder der Ascus (Schlauch), wird unterschieden.

Leider ist bei vielen Pilzen noch keine Geschlechtsform bekannt. Pilze, die sexuelle Sporen bilden, werden als Fungi perfecti zusammengefasst, wohingegen Pilze, von denen bisher nur asexuelle Sporen bekannt sind, dem künstlichen System der Fungi imperfecti (heterogene Gruppe der Deuteromyceten) untergeordnet sind. In der Medizin dienen derzeit meist noch die anamorphen Strukturmerkmale zur Namensgebung.

Pathogene Pilze stammen zum Großteil aus der Gruppe der Deuteromyceten, da von den meisten keine teleomorphe Form bekannt ist.

Heute werden zur Identifizierung von Pilzen zusätzlich molekularbiologische Methoden eingesetzt, um die genetischen Verwandtschaftsgrade zu ermitteln und sie in ein phylogenetisches System einzuordnen.

Tabelle 1: Einteilung der Pilze nach botanischen Kriterien

Echte Pilze (Eumyzetten): chitinhaltig	
Niedere Pilze Zygomycota (= Jochpilze)	<i>Mucor, Absidia, Apophysomyces, Rhizopus, Rhizomucor, Cunninghamella, Saksenaea</i>
Höhere Pilze Chytridiomycota	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>
Ascomycota (= Schlauchpilze)	<i>Saccharomyces, Ajellomyces, Neosartorya, Arthroderma, Pneumocystis, Morchella, Tuber</i> (Trüffel)
Basidiomycota (= Ständerpilze)	<i>Boletus edulis, Agaricus, Amanita, Ustilago, Cryptococcus</i>
Deuteromycota (= fungi imperfecti)	<i>Candida albicans, Trichosporon, Epidermophyton, Coccidioides, Alternaria, Trichophyton, Microsporum, Histoplasma, Aspergillus, Penicillium, Geotrichum</i>

Nach ihrem Wachstum können zwei verschiedene Pilzgruppen unterschieden werden:

- A) Fadenartige (filamentöse) Zellen bilden Zellfäden (Hyphen), die sich verzweigen und in ihrer Gesamtheit als Myzel (echtes Myzel) bezeichnet werden. Das Myzel dient wie ein Röhrensystem dem Stoffaustausch. Die Hyphen sind durch Zwischenwände (Septen) unterteilt (septiert) oder unseptiert. Pilze, die durch ein Geflecht von Hyphen (Myzel, Luftmyzel) charakterisiert sind und flauschig-wollige, gipsige oder lederartige Kolonien bilden, werden als Fadenpilze (engl. molds, Schimmelpilze und Dermatophyten) bezeichnet.
- B) Abgerundete sprossende Zellen gehen aus dem Prozess der Sprossung hervor, wobei Anteile vom Zytoplasma mit Zellkern als Tochterzellen von der Mutterzelle abgeschnürt werden. Die Sprosszellen können als Einzelzellen oder als Zellverband (Pseudohyphen, Pseudomyzel) den Vegetationskörper von Hefen bilden.

1.4.2 D-H-S-System: Einteilung medizinisch wichtiger Pilze

Für praktische Zwecke, vor allem in der Medizin, ist die botanische Einteilung wenig geeignet. Obwohl sie bei den Botanikern sehr unbeliebt ist, hat sich hier, vor allem im deutschsprachigen Raum, die Einteilung der medizinisch relevanten Pilze nach dem D (Dermatophyten) - H (Hefepilze) - S (Schimmelpilze) - System bewährt. Aus der Zugehörigkeit zu einer dieser Gruppen können bereits wichtige Schlussfolgerungen für die Ätiologie, Therapie und Epidemiologie abgeleitet werden.

Eine Sonderstellung nimmt die dimorphe oder biphasische Pilzgruppe ein, welche sich temperaturabhängig bzw. gewebsabhängig einem Gestaltwechsel (Dimorphismus) unterziehen kann. Im weiteren Sinne trifft der Begriff dimorph für alle Pilzarten zu, die aus einer Hefeform in eine Fadenform (Hyphen) übergehen können.

Ebenso beliebt ist die Gruppierung der Pilze nach ihrem pathogenetischen Verhalten:

Pathogene Pilze sind Pilze, die im Wirt, auch ohne besondere Prädisposition, Krankheiten auslösen und nicht zur Normalflora gehören.

Opportunistische Pilze (fakultativ pathogene Pilze) sind Pilze, die gewöhnlich als Saprophyten im Wirt bzw. in der Außenwelt vorkommen, sich jedoch unter bestimmten prädisponierenden Umständen im Wirt so stark vermehren, dass sie Krankheiten auslösen.

Apathogene Pilze sind Pilze, die im mykosedisponierten Wirt im Allgemeinen keine Krankheit hervorrufen.

Jedoch ist zu bedenken, dass die Bezeichnungen pathogen und apathogen nicht ohne Ausnahmen gelten und dass selbst pathogene Pilze mit hoher Virulenz oft erst dann eine Mykose auslösen, wenn der Wirt vorgeschädigt, d. h. disponiert ist. Doch sind opportunistische Pilze durchaus keine harmlosen Mikroorganismen.

Schimmelpilze stellen keine systematisch abgegrenzte und exakt definierte Pilzgruppe dar. Sie fallen durch raschwüchsige Fadenpilzkolonien mit meist kräftiger Farbgebung und massenhafter Bildung asexueller Sporen im Vergleich zu Dermatophyten auf. Die als opportunistische Krankheitserreger und als Kontaminanten interessierenden Schimmelpilze gehören zu den *Zygomycotina*, *Ascomycotina*, und *Deuteromycotina*. Medizinisch bedeutsam sind *Mucorales*, *Aspergillus*-Arten (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*), *Scopulariopsis brevicaulis* und weitere Schimmelpilzarten.

1.4.3 Aufbau der Pilzzelle

Pilze besitzen im Gegensatz zu den prokaryontischen Bakterien einen Zellkern, der mit einer Kernmembran vom Zytoplasma abgetrennt ist, sowie mehrere Chromosomen, welche in haploider oder in diploider Form vorkommen können.

Zytoplasma

Im Zytoplasma der Pilzzellen werden verschiedene Zellorganellen gefunden, welche Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede zu anderen Pflanzen und Lebewesen aufweisen:

Es beinhaltet die Ribosomen im endoplasmatischen Retikulum. In die ribosomalen Proteine eingehüllt sind lange RNS-Stränge, die bei allen eukaryontischen Zellen konserviert sind. Darin gibt es auch Abschnitte, die nur bei Pilzen und zwar bei allen Pilzen gleichermaßen vorkommen. Neben diesen semikonservierten Strecken gibt es noch einzelne hochvariable Strecken, die jeweils für eine bestimmte Pilzart oder Pilzgruppe charakteristisch sind. Diese Besonderheiten können für die genetische Bestimmung von Isolaten genutzt werden.

Die Mitochondrien sind vergleichbar mit anderen Lebewesen. Pilzzellen sind nicht unbedingt auf die Funktionstüchtigkeit von Mitochondrien angewiesen, denn bei ausreichender Versorgung mit Glucose können sie durch Glycolyse alleine genügend Energie schaffen. Für die oxidative Phosphorylierung von Substraten sind sie jedoch unabdingbar.

Pilze besitzen keine Chloroplasten und produzieren kein Chlorophyll. Für die Verwertung von Fettsäuren besitzen sie Peroxisomen. Die meisten Pilzzellen besitzen wie Pflanzenzellen eine oder mehrere große flüssigkeitsgefüllte Vakuolen, welche hydrolytische Enzyme enthalten.

Auch Golgi-Vesikel sind in Pilzen vorhanden. Dort wird z. B. die Chitinsynthase in eine Vesikelwand verpackt und in die Zellwand transportiert.

Pilzzellen haben auch ein inneres Zytoskelett. Lange Proteinzylinder, die Mikrotubuli, durchziehen das Zytoplasma und dienen zur intrazellulären Motilität von Organellen.

Zytoplasmatische Membran

Ein ganz wesentlicher Unterschied zwischen einer Pilzzelle und anderen Eukaryonten liegt im chemischen Aufbau der zytoplasmatischen Membran, einer Lipiddoppelschicht. Anstelle von Cholesterin, wie bei menschlichen und tierischen Zellen üblich, wird hier Ergosterol als häufigster Fettkörper eingebaut und bietet einen selektiven Angriffspunkt für Chemotherapeutika.

Die zytoplasmatische Membran ist Sitz vieler wichtiger Enzyme und Rezeptoren.

Zellwand

Ein weiteres Charaktermerkmal der Pilzzellen ist das Vorhandensein einer starren Zellwand, ähnlich zu den Bakterien aber mit unterschiedlicher Textur. Bei Pilzen kommt kein Peptidoglykan vor. Vielmehr besteht die Zellwand bei Pilzen zu 90% aus Polysacchariden, nämlich Glukanen, Mannanen und bei allen echten Pilzen auch Chitin. Dieses wabige, dreidimensionale Stützskelett ist ausgefacht mit Füllmaterial ähnlich wie ein Patchwork, also nicht ganz regelmäßig. Als Füllmaterial dienen Polymere aus Mannose.

Die eigentliche Rolle dieser rigiden Zellwand ist die Reißfestigkeit. Wenn diese Hülle nicht mehr stabil ist, so quillt die Pilzzelle und platzt schlussendlich.

Einige der modernen Antimykotika wie die Echinocandine (Caspofungin) greifen in die Zellwandsynthese ein.

1.4.4 Physiologie

Die Vermehrung der Pilze ist von Licht, Sauerstoff, pH-Wert, Nährstoffangebot und der Temperatur abhängig.

Eisen ist ein essentieller Wachstumsstoff für Pilze. Zwei Möglichkeiten bestehen sich damit anzureichern. Zum einen wird mittels Ferroreductasen Fe^{3+} zu Fe^{2+} reduziert, welches sich dann von seinem Träger, dem Transferrin, lösen kann. Zum anderen bilden Pilze Siderophore (gr. Eisenträger), welche eine höhere Affinität zu Eisen besitzen als Transferrin. Die beladenen Siderophore werden dann durch spezielle Transportmechanismen aufgenommen. Gelegentlich können Pilze von anderen Mikroorganismen deren beladene Eisenträger übernehmen.

Enolase, ein Enzym, das vor allem in der Glycolyse wirksam ist, kommt im Zytoplasma und in der Zellwand vor. In der Zellwand ist es auch eines der stärksten Antigene, ein immunogenes Protein.

Von vielen Sprosspilzen ist die Produktion von Äthanol aus Glukose bekannt (alkoholische Gärung).

Schimmelpilze können unter bestimmten Wachstumsbedingungen andere sekundäre Metaboliten synthetisieren. Für Mensch und Tier wirken diese Stoffe (Mykotoxine) toxisch.

Manche Pilze bilden Farbstoffe, wie Carotinoide, Naphtochinone oder Melanin, um besser in widrigen Umweltverhältnissen überleben zu können.

Killertoxine können sezerniert werden, um andere Arten zu zerstören.

Ähnlich dazu werden Antibiotika produziert, wodurch Bakterienkonkurrenz ausgeschaltet wird.

Praktisch alle pathogenen Pilze bilden Prostaglandine und Leukotriene.

1.4.5 Lebensbedingungen und Lebensweise medizinisch wichtiger Pilze

Drei Ernährungsmöglichkeiten stehen den Pilzen in der Natur zur Verfügung.⁴³

- Saprophytismus: Aufschluss abgestorbener Organismen oder auch nur Teile von ihnen in Form von saprotropher Ernährung.
- Parasitismus: Befall gesunder oder z. B. durch Stress vorgeschädigter Lebewesen und Entnahme des Benötigten aus dem lebenden Wirtsgewebe in Form biotropher Ernährung.
- Symbiose: Anschluss an den Stoffwechsel des Partners bei gleichzeitiger Lieferung von eigenen Produkten, also zum weitgehenden gegenseitigen Nutzen.

Die human-tierpathogenen Pilze haben eine hohe Anpassungsfähigkeit an verschiedenste Umweltbedingungen. Sie leben als obligate und fakultative Parasiten oder Kommensalen im Warmblüterorganismus und als Saprophyten in der freien Natur oder auf Kulturmedien im Labor.

Die fakultativen Parasiten, zu denen die Mehrzahl der Krankheitserreger unter den Pilzen gehört, sind in der Lage, ständig von der parasitären in die saprophytäre Lebensweise und umgekehrt überzuwechseln.

Pilze leben als chlorophyllfreie Organismen heterotroph. Sie sind auf die Zufuhr von Kohlenstoff- und Stickstoffquellen und auf bestimmte Nährbodenvoraussetzungen (Wassergehalt und pH-Wert des Substrates) angewiesen. Ihre Ansprüche sind unterschiedlich, im Allgemeinen gering. Sie erhalten Energie durch oxydativen Abbau von Glucose. Für die meisten Pilze sind Temperaturen von 20 bis 40°C und eine relative Luftfeuchtigkeit von 75 bis 95% für Wachstum und Sporulation optimal.

Für die primäre zelluläre Abwehr beim Menschen sind die zahlenmäßig und funktionell intakten Granulozyten zuständig. Mit zunehmender Dauer und Ausprägung der Granulozytopenie steigt das Infektionsrisiko. Ihre Rolle wird deutlich, wenn diese Zellen fehlen, nämlich bei Neutropenie nach myelosuppressiver Therapie einer Leukämie, oder wenn sie defekt sind, wie bei der chronischen Granulomatose oder bei Di-

abetes, wo die Funktionen der Chemotaxis sowie des oxidativen Burst vermindert sind.

Zusätzlich kommen die Makrophagen ins Spiel. Alveolarmakrophagen und Makrophagen in einem entzündlichen Gebiet sind durch ihre Zytokinkonstellation so aktiviert, dass sie mühelos phagozytierte Pilze innerhalb kurzer Zeit inaktivieren und eliminieren können.

Bei Diabetikern zeigen Makrophagen eine Dysfunktion und sind nicht mehr in der Lage Sporen abzutöten. Unter Kortison ist die Abfolge der entzündlichen Reaktionen vermindert.

Die Suppression der über T-Zellen vermittelten Immunität bei Kortikosteroidtherapie, AIDS, Organtransplantationen schwächt ebenso die Abwehr gegen Pilze.

Die Körperoberfläche des Menschen weist eine natürliche Resistenz gegen Pilzinfektionen auf:

- normale Proliferation der Epidermis
- fungistatisch wirksame Verbindungen auf der Hautoberfläche (freie Fettsäuren, Cerumen, Talg)
- pH-Wert zwischen 5,0 und 6,0 (Säuremantel)
- antagonistische Wirkung der Standardflora
- intakte Epithelzellschicht

Eine durch Feuchtigkeit gequollene Hornschicht und selbst geringfügige Verletzungen begünstigen die Ansiedlung von Pilzen. Die ökologische Nische auf der Haut ist auch umkämpft von anderen Mikroorganismen, welche eine Pilzbesiedelung unterdrücken. Werden diese schützenden Mikroorganismen eliminiert, wie z. B. nach Antibiose, können Pilzbesiedelungen leichter auftreten.

Dermatophyten produzieren Elastasen, Collagenasen und Keratinasen, welche durch die Verdauung der Wirtsprodukte essentielle Nährstoffe freisetzen, wodurch ein Überleben auf der Haut ermöglicht wird. Bei Sprosspilzen und Schimmelpilzen ist dies ganz ähnlich. Durch diesen Verdauungsprozess wird aber auch die natürliche Barriere zerstört und ein Eindringen von Pilzen in das Gewebe ermöglicht.

Die Manifestation einer Mykose kann in mehreren, zeitlich mitunter weit auseinander liegenden Schritten erfolgen:

Kontamination: Der Makroorganismus kommt mit Pilzzellen in Berührung.

Adhäsion: Pilzzellen haften auf der Haut.

Kolonisation: Besiedlung, d. h. bloße Anwesenheit von Pilzzellen als Kommensalen (Tischgenossen) auf Haut- und Schleimhautbereichen ohne klinische Krankheitszeichen.

Inkorporation: Endothelzellen können Pilzzellen inkorporieren.

Infektion: aktives Eindringen von Pilzen ins Wirtsgewebe unter Vermehrung der Pilze im Gewebe und/oder in Körperflüssigkeiten, woraus eine Reaktion des Wirtes resultiert.

Invasion: Fortschreiten der Infektion, eventuell unter Anschluss an Blut- und Lymphgefäße bzw. Nervenbahnen.

Infektionskrankheit: Mykose = Manifestation klinischer Lokal- oder Allgemeinsymptome als Folge der Infektion, besonders bei Patienten mit reduzierter Infektabwehr.

1.4.6 Mykopathien

Der Terminus Mykopathie umfasst alle durch Makro- und Mikromyzenten hervorgerufenen Zustandsänderungen des Makroorganismus oder eines Gewebes. Folgende Formen sind zu unterscheiden:

Mykosen: Durch Mikromyzenten bedingte Prozesse, bei denen pathogene Erreger vitales Wirtsgewebe befallen, sich in ihm ausbreiten, vermehren und Destruktionen verursachen. Zwei verschiedene Pathomechanismen sind zu unterscheiden.

Primäre Mykose: Der Erreger ist obligat pathogen. Das Gewebe bzw. der Makroorganismus ist anatomisch und funktionell normal. Die Therapie richtet sich gegen den Erreger.

Sekundäre Mykose: Der Erreger ist Opportunist. Im Gewebe bzw. Makroorganismus bestehen abnorme anatomische oder funktionelle (z. B. zirkulatorische oder immunologische) Verhältnisse. Die therapeutischen Maßnahmen müssen sich gegen den Erreger und gegen die mykosedisponierenden Faktoren richten.

Mykotisation: Nach der Definition von Male (1981) handelt es sich um eine nosoparasitische Besiedlung örtlich begrenzter Gewebsanomalien durch opportunistische Pilze. Die Gewebsanomalien können angeboren oder erworben sein (Zysten, Divertikel, Ulzera, Verbrennungsnekrosen, Kavernen). Im Gegensatz zu den Mykosen bleibt der mykotische Prozess in der Regel auf das pathologische Areal beschränkt. Zu einer Ausbreitung der Pilze auf intaktes Gewebe oder zu einer Generalisierung kann es jedoch beim Hinzutreten exogener und endogener mykosedisponierender Einflüsse kommen.

Mykoallergosen: Umfassen alle durch Pilzallergene hervorgerufenen Allergieförmungen.

Mykotoxikosen: Intoxikationen durch Mykotoxine.

Myzetismus: Intoxikation durch giftige Makromyzeten (Knollenblätterpilze), die mit Speisepilzen verwechselt werden.

1.5 Ziel der Arbeit

Otomykosen sind seit der Mitte des 19. Jahrhunderts bekannt und stellen heutzutage in tropischen und subtropischen Gebieten längst keine klinische Besonderheit mehr dar.

Trotzdem wird dieser Erkrankung vor allem in Europa und Amerika in Lehrbüchern und auch von Ärzten, die im Hals-Nasen-Ohrenbereich tätig sind, immer noch zu wenig Beachtung geschenkt. Ein Ziel dieser Arbeit soll sein, diese pilzbedingten Otitiden ins Gedächtnis zu rufen und die Häufigkeit von Pilzbefunden im Raum Graz zu eruieren.

Aspergillus niger wird weltweit gesehen am häufigsten als Agens in Otomykosefällen isoliert. Dieser Schimmelpilz gehört einer Untergruppe von schwarzen Aspergillen, der *Aspergillus section nigri*, an, welche mit ihm verwechselt werden können. Die *Aspergillus section nigri* besteht zurzeit aus 19 Arten.⁵⁶ Darüber findet sich in der

Literatur über Otomykosen kein Hinweis, denn hier wird lediglich bis zum Species Level differenziert.

Da nicht alles was schwarz ist sofort *Aspergillus niger* zugeordnet werden kann, zumal seitens der Morphologie und Mikroskopie kaum Unterschiede erkennbar sind, sollten die schwarzen Kulturen, welche von Patientinnen und Patienten aus dem menschlichen Gehörgang in den Universitätskliniken für HNO in Graz und Innsbruck isoliert wurden, molekularbiologisch analysiert werden um eine exakte Klassifizierung vornehmen zu können.

Hauptaugenmerk der Arbeit lag in der molekularbiologischen Differenzierung der *A. niger*-Gruppe (Men in Black).

Weiters sollten die gesamten Daten der positiven Pilzbefunde aus dem Ohr im Großraum Graz in einem definierten Zeitraum (2006 bis 2010) ausgewertet und neben dem Erheben demographischer Daten, ein Erregerspektrum erhoben werden.

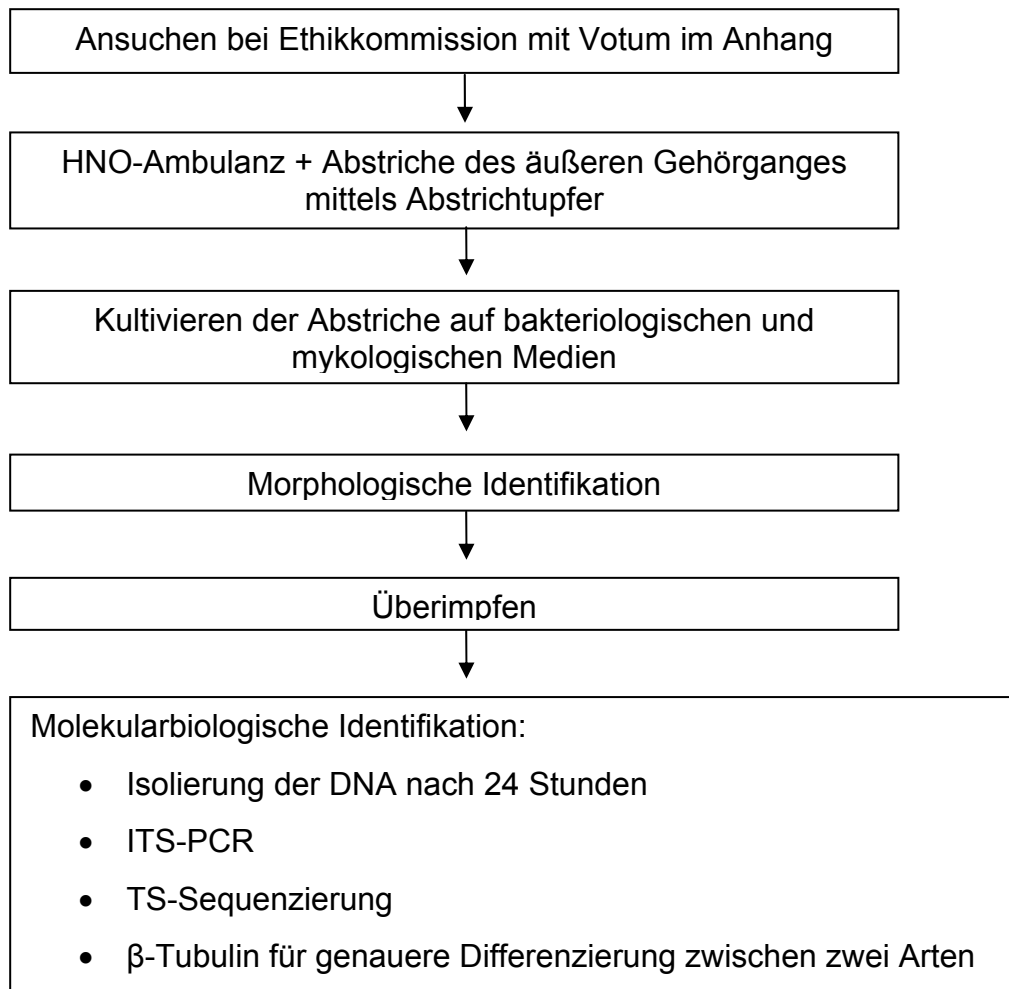
Ergänzend sollten von anonymisierten Patienten aus dem Probengut, deren Daten zur Verfügung standen, Krankenakten durchgesehen, um eine Gegenüberstellung in den Bereichen Pilzbefund, mit Berücksichtigung der Begleitflora, um eventuelle bakterielle sowie mykologische Nebenbefunde mitzuerfassen, Symptome, Ohrmikroskopie, Vorhandensein von Grunderkrankungen, Therapie und Krankheitsverlauf zu erfassen und mit der Literatur zu vergleichen.

Obwohl die Otomykose längst eine klinische Entität geworden ist, bestehen noch viele Unsicherheiten im Umgang mit dieser Krankheit. Zu unterscheiden sind Fälle, wobei lediglich eine Kolonisation (Besiedelung) von Pilzen vorhanden ist, von schwerwiegenderen Fällen, welche unter anderem zu einer infektiösen Otitis externa maligna führen können. Viele Krankheitserreger sind bekannt, Prädispositionen werden diskutiert.

2. Material und Methoden

2.1 Arbeitsschritte

Organigramm der Arbeitsschritte, auf welche anschließend genauer eingegangen wird:



2.2 Probenmaterialien

Personen, bei denen in den Ambulanzen der HNO-Universitätskliniken Graz und Innsbruck eine Ohrinfektion diagnostiziert wurde, kamen für die Studie in Frage. Nach Aufklärung und Einwilligung der Studienteilnehmerinnen und Studienteilnehmer wurden Abstriche des äußeren Gehörganges mittels Abstrichtupfer (Copan Sterile Transport Swabs) entnommen.

Die retrospektive Erfassung der patientenbezogenen Daten in Bezug auf Geschlecht, Alter, Größe, Gewicht, Grunderkrankung, bakteriologischen und mykologischen Befund sowie deren Medikation erfolgte aus Medocs (Universitätsklinikum Graz) und dem Statistikprogramm BactLab (EKM) am Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin der medizinischen Universität Graz.

Das Kultivieren der Abstriche auf bakteriologischen und mykologischen Medien erfolgte gemäß den Richtlinien für Schleimhautabstriche des bakteriologisch-mykologischen Labors am Institut für Hygiene, die statistische Auswertung mit herkömmlichen Statistikprogrammen.

2.3 Nährmedien

Zwei unterschiedliche Nährmedien wurden verwendet. Selbst gegossenes Sabouraud Agar vom Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin der medizinischen Universität Graz und *Candida* Agar Can2 der Firma Biomérieux. Sie wurden bei je 30 und 35°C bebrütet.

Sabouraud Glucose Agarplatten für 1 Liter Medium.

Sabouraud Dextrose Agar (Oxoid CM41) 65 g

Unter Rühren erhitzen, bis die Lösung klar ist, danach 20 Minuten bei 121°C autoklavieren. Auf 50 bis 60°C abkühlen lassen. Jeweils 20 ± 2 ml pro Platte gießen. Im Kühlschrank (2-8°C) acht Wochen haltbar.

Morphologische Identifikation

Die Identifikation erfolgt auf Grund der Makro- und Mikromorphologie vor allem nach dem Atlas of Clinical Fungi.⁵⁴ Alles was aus dem Probenmaterial morphologisch der *Aspergillus niger*-Gruppe zugehörig erschien, wurde weiter molekularbiologisch differenziert.

2.4 Molekularbiologische Identifikation

Für die Molekularbiologische Identifikation wurden 24-h-Kulturen herangezogen, da Vorversuche gezeigt haben, dass bei älteren Kulturen die PCR durch schwarze Pigmente inhibiert wird.

2.4.1 DNA-Isolation

Die Isolierung der DNA erfolgt mit dem „Master PureTM Yeast DNA Purification Kit“ der Fa. Epicentre nach folgendem Protokoll:

- In ein autoklaviertes 1,5 ml Eppi werden 300 µl Yeast Cell Lysis Solution vorgelegt.
- Ein kleines Stück der Pilzkolonie wird dazugegeben und die Probe mit einem Pistill homogenisiert.
- Die Probe wird bei 65°C für 15 min im Thermoblock inkubiert und anschließend für 5 min auf Eis gestellt.
- 150 µl Protein Precipitation Reagent werden zugegeben und für 15-20 sec homogenisiert (Vortex).
- Zentrifugation für 10 min mit 9300 rcf bei RT.
- Der Überstand wird in ein neues Eppi überführt, 500 µl Isopropanol zugegeben und kurz geschüttelt.
- Zentrifugation für 10 min mit 9300 rcf bei RT.
- Der Überstand wird abgehoben und verworfen.
- Zugabe von 500 µl 70%igem Ethanol.
- Zentrifugation für 5 min mit 9300 rcf bei RT.
- Der Überstand wird abgehoben und verworfen.
- Das Pellet wird im Trockenschrank bei 45°C für 15 min oder für 2-3 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet.
- Das Pellet wird je nach Größe in 50 oder 100 µl (gut sichtbar) A. d. gelöst.

2.4.2 PCR

Für die DNA-Sequenzierung muss die DNA amplifiziert werden, damit sie in ausreichend hoher Kopienzahl (> 100 Millionen Kopien) vorliegt. Mittels PCR wird der ITS-Bereich inklusive der 5,8S Untereinheit der ribosomalen DNA vervielfältigt. Es werden die Primer ITS4 und ITS5 zur Amplifizierung verwendet.

Die ribosomalen Gene bestehen aus der 18S (kleine Untereinheit), der 5,8S und der 28S (große Untereinheit). Dazwischen liegen die nicht codierenden Bereiche ETS (external transcribed spacers) und ITS (internal transcribed spacers). rDNA-Sequenzen wurden bereits für Taxonomie, Phylogenie und zur Identifikation von vie-

len Pilzen verwendet. Die Variation der nicht-codierenden ITS-Region wird zur Differenzierung von Gattungen und Populationen herangezogen.

Für die PCR-Reaktion wird zunächst ein „master mix“ vorbereitet, in dem alle Komponenten (Primerpaar, die vier Nukleotide, Puffer und DNA Polymerase) bis auf die DNA enthalten sind. Je 18,8 µl davon werden in 0,2 ml Reaktionsgefäß-Ketten pipetiert und jeweils 1,2 µl DNA hinzugefügt. Mit jedem Ansatz werden eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt.

Zur genauen Differenzierung zwischen *Aspergillus tubingensis* und *Aspergillus foetidus* wurde das β -Tubulin Gen mit den Primern bt2a und bt2b amplifiziert und sequenziert.

Verwendete Primersequenzen:

ITS5 5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3'

ITS4 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'

bt2a: 5'-GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC-3'

bt2b: 5'-ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC-3'

Die PCR wird in den **Thermocyclern** GeneAmp PCR Systems 9700 und 2400 der Fa. Applied Biosystems nach folgendem Schema durchgeführt:

- Denaturierung 94°C, 2 min
 - Denaturierung 94°C, 45 sec
 - Primer Anlagerung 48°C, 45 sec
 - Verlängerung 68°C, 1 min 30 sec
 - Verlängerung 68°C, 5 min
 - Aufbewahrung 8°C ∞
- } 30 Zyklen

Gelelektrophorese:

Die PCR-Produkte werden in einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Dazu werden 2 µl der PCR-Produkte mit 3 µl Ladepuffer (Fa. Fermentas) vermischt und auf das Gel aufgetragen. Als Längenmaß werden 2 µl des DNA-Standards (100 bp Leiter der Fa. Fermentas) mit 3 µl Ladepuffer (Fa. Fermentas) vermischt und aufgetragen. Die Elektrophorese wird mit 80 Volt für 20 Minuten in 1X TAE-Puffer durchgeführt. Die mit Ethidiumbromid (Fa. Merck) markierten PCR-Produkte werden unter dem UV-Transilluminator GelDoc2000 der Fa. BioRad kontrolliert.

Aufreinigung der PCR-Produkte:

Um die PCR-Produkte für das Cycle Sequencing einsetzen zu können, werden diese mit dem Invisorb Spin PCRapid Kit der Fa. Invitex aufgereinigt. Dabei werden hauptsächlich Salze und Primerreste entfernt.

2.4.3 DNA-Sequenzierung

Sequenziert wird nach der Kettenabbruch- oder auch Sanger-Methode, bei der 2'3'-DiDesoxynukleotidtriphosphate (ddNTP) verwendet werden.

Im Gegensatz zu den Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) fehlt hier die OH-Gruppe am 3' Kohlenstoff und der Einbau eines ddNTP führt zu einem Kettenabbruch, da keine Phosphodiesterbindung mit dem nächsten dNTP gebildet werden kann. Es entstehen DNA-Fragmente, die sich um die Länge einer Base unterscheiden und immer mit einem der vier unterschiedlich fluoreszenzmarkierten ddNTPs enden. Diese DNA-Fragmente werden in Kapillaren injiziert, die mit einem Polymer gefüllt sind, und elektrophoretisch aufgetrennt. Dadurch wird eine DNA-Analyse mit einem automatischen Sequenzer (3130 Genetic Analyzer der Fa. Applied Biosystems) möglich. Alle vier verschiedenen fluoreszenzmarkierten ddNTPs befinden sich in einem Reaktionsgefäß. Die Reaktion wird mit dem BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (dNTPs, ddNTPs, DNA-Polymerase, MgCl₂, Pyrophosphat, Puffer) der Fa. Applied Biosystems durchgeführt.

Der Primer ITS5 bzw. der Primer bt2a wird in einer Konzentration von 1,6 µM eingesetzt.

Cycle-sequencing-Ansatz:

- A.d. 4,2 µl
- 5x Puffer (Applied Biosystems) 2 µl
- BigDye (Applied Biosystems) 1,8 µl
- Primer ITS5 1,6 µm (genexpress) 1 µl
- Template 1 µl

Temperaturprogramm Cycle sequencing:

- Denaturierung 94°C, 18 sec
 - Denaturierung 94°C, 15 sec
 - Primer Anlagerung 50°C, 10 sec
 - Verlängerung 60°C, 2 min
 - Aufbewahrung 8°C, ∞
- } 25 Zyklen

Aufreinigung der Cycle-Sequencing-Produkte:

Für die Sequenzanalyse am Sequenzer werden die Cycle-Sequencing-Produkte nach folgendem Protokoll aufgereinigt, um die überschüssigen Reagenzien des Cycle Sequencing zu entfernen:

- In ein 1,5 ml Eppi wird das Cycle-Sequencing-Produkt pipettiert, mit 2,5 µl 125 mM EDTA und 25 µl 96% EtOH versetzt und homogenisiert.
- Zentrifugation für 20 min bei 4°C mit 16100 rcf.
- Der Überstand wird abgehoben und verworfen.
- Das Pellet wird mit 200 µl 70% EtOH gewaschen.
- Zentrifugation für 15 min bei 4°C bei 16100 rcf.
- Der Überstand wird verworfen.
- Das Pellet wird im Trockenschrank bei 45°C für 15 min oder für 2-3 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet.
- Das Pellet wird in 15 µl HiDi (Formamid, Fa. Applied Biosystems) gelöst.

2.4.4 Sequenzanalyse und Datenbank

Die Sequenzanalyse erfolgte mit dem 3130 Genetic Analyzer der Fa. Applied Biosystems. Die Kapillaren werden mit dem Polymer POP 7 (Performance Optimized Polymer) befüllt. Als Puffer dient ein 1x EDTA-Puffer der Fa. Applied Biosystems.

Die Sequenzen werden mit dem Programm „Sequencing Analysis 5.2“ auf ihre Signalintensität und eventuelle Sequenzüberlagerungen überprüft. Signale mit ausreichender Peakhöhe und guter Auftrennung der einzelnen Basenpeaks werden mit bestehenden Sequenzen aus der Datenbank „Fasta Nucleotide Database“ von EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33/nucleotide.html>) verglichen.

3. Ergebnisse

3.1 Morphologie

Die Kulturen wurden zunächst einer makroskopischen sowie mikroskopischen Kontrolle unterzogen (Abbildungen 2-7). Hierbei konnte von unserer Seite keine Differenzierung durchgeführt werden.



Abbildung 2: *Aspergillus foetidus* Kultur auf Sabouraud

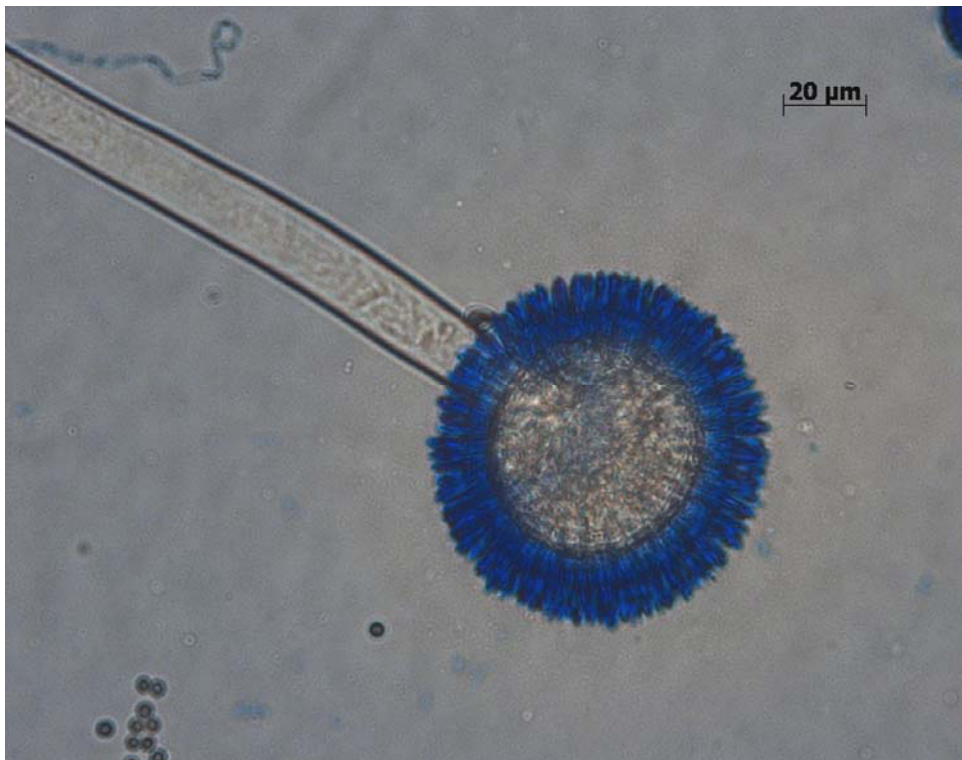


Abbildung 3: *Aspergillus foetidus* mikroskopisch



Abbildung 4: *Aspergillus niger* Kultur auf Sabouraud



Abbildung 5: *Aspergillus niger* mikroskopisch

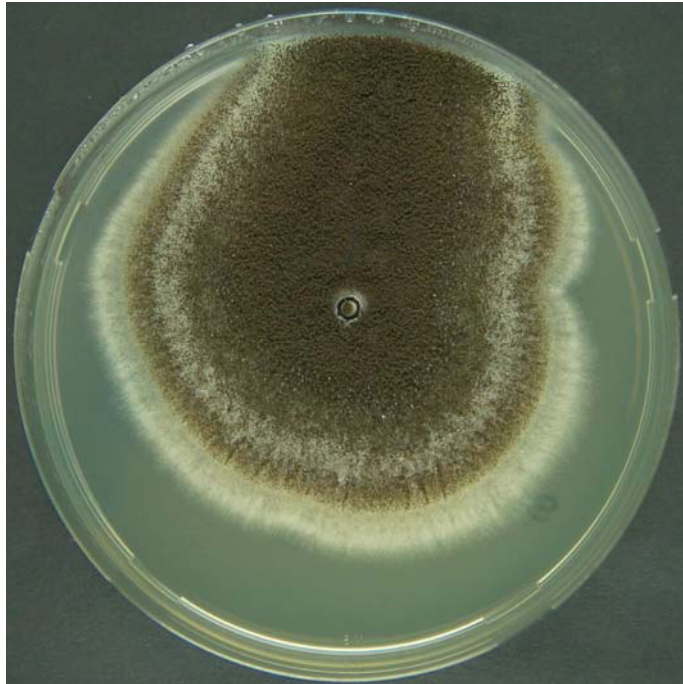


Abbildung 6: *Aspergillus tubingensis* Kultur auf Sabouraud



Abbildung 7: *Aspergillus tubingensis* mikroskopisch

Zwischen den einzelnen Aspergillusarten konnten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden.

3.2 Molekularbiologische Ergebnisse

Da makroskopisch und mikroskopisch keine sichtbaren Unterschiede zwischen den schwarzen *Aspergillen* bestanden, strebten wir eine molekularbiologische Identifikation unter Zuhilfenahme der für viele Pilze variablen und nicht codierenden ITS-Region der ribosomalen DNA sowie dem β -Tubulin Gen an.

Von unseren Pilzen wurde die DNA isoliert und nach der PCR startete die Sequenzanalyse.

3.2.1 DNA-Isolation und PCR

Als ersten Kontrollschritt für eine gelungene PCR diente das Agarosegel mit unseren PCR-Produkten. Mit jenen Proben, deren Banden gut sichtbar waren, konnte mit der Aufreinigung und Sequenzierung begonnen werden.

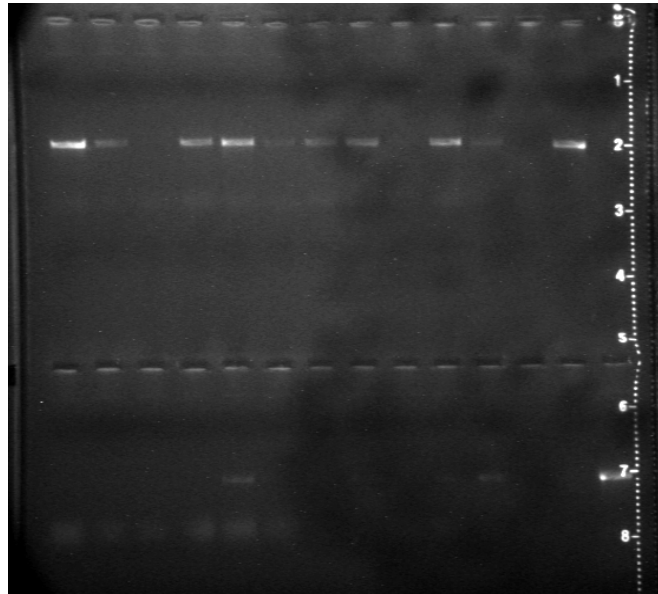


Abbildung 8: Agarosegel von PCR-Produkten (ITS), gefärbt mit EtBr

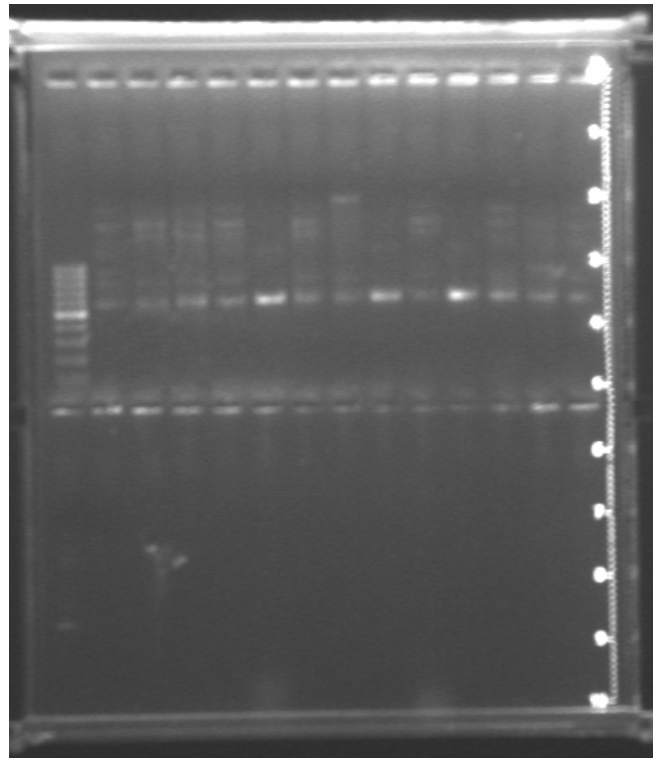


Abbildung 9: : Agarosegel von PCR-Produkten (β -Tubulin), gefärbt mit EtBr

3.2.2 DNA-Sequenzierung

ITS-Region

Die CBS Stämme von *Aspergillus niger* (CBS 554.65), *Aspergillus foetidus* (CBS 56465) und *Aspergillus tubingensis* (CBS 134.48) wurden als Referenz herbeigezogen. Auf Grund der Basenunterschiede bei G 56 A, C 109 T, C 514 T (Alignement siehe unten) wurde *Aspergillus niger* von *Aspergillus foetidus* und *Aspergillus tubingensis* unterschieden. Zwischen den beiden letzteren wurde eine Differenzierung anhand des β -Tubulin codierenden Gens angestrebt.

Alignment der ITS Sequenzen der untersuchten Pilzproben (Seite 34-45)

32098	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
J40972	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
29213	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
137483	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
18879	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
26285	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
A.foetidus_CBS_56465	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
A.tubigenis_CBS_134.48	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
17_Innsbruck	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
15_Innsbruck	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
12_Innsbruck	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
11_Innsbruck	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
7_Innsbruck	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
6_Innsbruck	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
5_Innsbruck	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
3_Innsbruck	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
9914/10	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
18318/10	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
9755/10	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
35329/09	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
36873/09	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
29784/09	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
J33962/09	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
18917/09	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
J26753	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
18515/09	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
157/10	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
J03790/10a	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
J05749/10	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
J06089/10	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
J08693/10	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
6946/10	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
17935/10	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
18626/10	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
J22697/10	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
J23594/10	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
1_Innsbruck	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
2_Innsbruck	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
4_Innsbruck	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
8_Innsbruck	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
9_Innsbruck	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
10_Innsbruck	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
14_Innsbruck	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
16_Innsbruck	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
A.niger_CBS_554.65	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
J22248	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
J141101	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
J41102	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
J43990	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50
32557	AAGGATCATTACCGAGTGC GGGT CCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT	50

32098 CTATTATACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
J40972 CTATTATACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
29213 CTATTATACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
137483 CTATTATACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
18879 CTATTATACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
26285 CTATTATACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
A.foetidus_CBS_56465 CTATTATACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
A.tubigenensis_CBS_134.48 CTATTATACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
17_Innsbruck CTATTATACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
15_Innsbruck CTATTATACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
12_Innsbruck CTATTATACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
11_Innsbruck CTATTATACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
7_Innsbruck CTATTATACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
6_Innsbruck CTATTATACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
5_Innsbruck CTATTATACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
3_Innsbruck CTATTATACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
9914/10 CTATTATACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
18318/10 CTATTATACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
9755/10 CTATTATACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
35329/09 CTATTATACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
36873/09 CTATTATACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
29784/09 CTATTATACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
J33962/09 CTATTATACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
18917/09 CTATTATACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
J26753 CTATTATACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
18515/09 CTATTGTACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
157/10 CTATTGTACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
J03790/10a CTATTGTACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
J05749/10 CTATTGTACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
J06089/10 CTATTGTACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
J08693/10 CTATTGTACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
6946/10 CTATTGTACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
17935/10 CTATTGTACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
18626/10 CTATTGTACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
J22697/10 CTATTGTACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
J23594/10 CTATTGTACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
1_Innsbruck CTATTGTACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
2_Innsbruck CTATTGTACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
4_Innsbruck CTATTGTACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
8_Innsbruck CTATTGTACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
9_Innsbruck CTATTGTACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
10_Innsbruck CTATTGTACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
14_Innsbruck CTATTGTACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
16_Innsbruck CTATTGTACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
A.niger_CBS_554.65 CTATTGTACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
J22248 CTATTGTACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
J141101 CTATTGTACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
J41102 CTATTGTACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
J43990 CTATTGTACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100
32557 CTATTGTACCCGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCGCCGGGG 100

32098 GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
J40972 GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
29213 GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
137483 GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
18879 GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
26285 GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
A.foetidus_CBS_56465 GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
A.tubigenis_CBS_134.48 GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
17_Innsbruck GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
15_Innsbruck GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
12_Innsbruck GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
11_Innsbruck GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
7_Innsbruck GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
6_Innsbruck GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
5_Innsbruck GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
3_Innsbruck GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
9914/10 GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
18318/10 GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
9755/10 GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
35329/09 GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
36873/09 GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
29784/09 GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
J33962/09 GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
18917/09 GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
J26753 GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
18515/09 GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
157/10 GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
J03790/10a GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
J05749/10 GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
J06089/10 GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
J08693/10 GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
6946/10 GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
17935/10 GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
18626/10 GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
J22697/10 GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
J23594/10 GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
1_Innsbruck GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
2_Innsbruck GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
4_Innsbruck GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
8_Innsbruck GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
9_Innsbruck GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
10_Innsbruck GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
14_Innsbruck GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
16_Innsbruck GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
A.niger_CBS_554.65 GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
J22248 GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
J141101 GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
J41102 GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
J43990 GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
32557 GGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCCTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC 150
***** ** *****

32098 ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
J40972 ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
29213 ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
137483 ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
18879 ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
26285 ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
A.foetidus_CBS_56465 ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
A.tubigenensis_CBS_134.48 ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
17_Innsbruck ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
15_Innsbruck ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
12_Innsbruck ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
11_Innsbruck ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
7_Innsbruck ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
6_Innsbruck ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
5_Innsbruck ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
3_Innsbruck ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
9914/10 ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
18318/10 ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
9755/10 ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
35329/09 ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
36873/09 ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
29784/09 ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
J33962/09 ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
18917/09 ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
J26753 ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
18515/09 ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
157/10 ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
J03790/10a ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
J05749/10 ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
J06089/10 ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
J08693/10 ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
6946/10 ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
17935/10 ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
18626/10 ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
J22697/10 ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
J23594/10 ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
1_Innsbruck ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
2_Innsbruck ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
4_Innsbruck ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
8_Innsbruck ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
9_Innsbruck ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
10_Innsbruck ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
14_Innsbruck ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
16_Innsbruck ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
A.niger_CBS_554.65 ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
J22248 ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
J141101 ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
J41102 ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
J43990 ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200
32557 ACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAAAC 200

32098 TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
J40972 TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
29213 TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
137483 TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
18879 TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
26285 TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
A.foetidus_CBS_56465 TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
A.tubigenis_CBS_134.48 TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
17_Innsbruck TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
15_Innsbruck TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
12_Innsbruck TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
11_Innsbruck TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
7_Innsbruck TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
6_Innsbruck TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
5_Innsbruck TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
3_Innsbruck TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
9914/10 TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
18318/10 TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
9755/10 TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
35329/09 TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
36873/09 TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
29784/09 TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
J33962/09 TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
18917/09 TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
J26753 TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
18515/09 TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
157/10 TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
J03790/10a TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
J05749/10 TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
J06089/10 TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
J08693/10 TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
6946/10 TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
17935/10 TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
18626/10 TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
J22697/10 TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
J23594/10 TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
1_Innsbruck TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
2_Innsbruck TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
4_Innsbruck TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
8_Innsbruck TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
9_Innsbruck TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
10_Innsbruck TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
14_Innsbruck TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
16_Innsbruck TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
A.niger_CBS_554.65 TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
J22248 TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
J141101 TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
J41102 TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
J43990 TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250
32557 TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 250

32098 TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
J40972 TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
29213 TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
137483 TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
18879 TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
26285 TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
A.foetidus_CBS_56465 TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
A.tubigenensis_CBS_134.48 TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
17_Innsbruck TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
15_Innsbruck TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
12_Innsbruck TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
11_Innsbruck TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
7_Innsbruck TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
6_Innsbruck TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
5_Innsbruck TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
3_Innsbruck TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
9914/10 TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
18318/10 TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
9755/10 TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
35329/09 TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
36873/09 TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
29784/09 TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
J33962/09 TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
18917/09 TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
J26753 TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
18515/09 TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
157/10 TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
J03790/10a TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
J05749/10 TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
J06089/10 TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
J08693/10 TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
6946/10 TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
17935/10 TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
18626/10 TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
J22697/10 TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
J23594/10 TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
1_Innsbruck TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
2_Innsbruck TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
4_Innsbruck TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
8_Innsbruck TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
9_Innsbruck TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
10_Innsbruck TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
14_Innsbruck TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
16_Innsbruck TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
A.niger_CBS_554.65 TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
J22248 TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
J141101 TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
J41102 TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
J43990 TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300
32557 TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAATCATCGAGTCTTTGA 300

32098 ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
J40972 ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
29213 ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
137483 ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
18879 ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
26285 ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
A.foetidus_CBS_56465 ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
A.tubigenensis_CBS_134.48 ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
17_Innsbruck ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
15_Innsbruck ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
12_Innsbruck ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
11_Innsbruck ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
7_Innsbruck ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
6_Innsbruck ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
5_Innsbruck ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
3_Innsbruck ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
9914/10 ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
18318/10 ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
9755/10 ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
35329/09 ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
36873/09 ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
29784/09 ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
J33962/09 ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
18917/09 ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
J26753 ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
18515/09 ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
157/10 ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
J03790/10a ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
J05749/10 ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
J06089/10 ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
J08693/10 ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
6946/10 ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
17935/10 ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
18626/10 ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
J22697/10 ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
J23594/10 ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
1_Innsbruck ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
2_Innsbruck ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
4_Innsbruck ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
8_Innsbruck ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
9_Innsbruck ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
10_Innsbruck ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
14_Innsbruck ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
16_Innsbruck ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
A.niger_CBS_554.65 ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
J22248 ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
J141101 ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
J41102 ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
J43990 ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350
32557 ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCGTGTCGAGCGTC 350

32098 ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
J40972 ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
29213 ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
137483 ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
18879 ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
26285 ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
A.foetidus_CBS_56465 ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
A.tubigenensis_CBS_134.48 ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
17_Innsbruck ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
15_Innsbruck ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
12_Innsbruck ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
11_Innsbruck ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
7_Innsbruck ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
6_Innsbruck ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
5_Innsbruck ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
3_Innsbruck ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
9914/10 ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
18318/10 ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
9755/10 ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
35329/09 ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
36873/09 ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
29784/09 ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
J33962/09 ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
18917/09 ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
J26753 ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
18515/09 ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
157/10 ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
J03790/10a ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
J05749/10 ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
J06089/10 ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
J08693/10 ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
6946/10 ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
17935/10 ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
18626/10 ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
J22697/10 ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
J23594/10 ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
1_Innsbruck ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
2_Innsbruck ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
4_Innsbruck ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
8_Innsbruck ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
9_Innsbruck ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
10_Innsbruck ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
14_Innsbruck ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
16_Innsbruck ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
A.niger_CBS_554.65 ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
J22248 ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
J141101 ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
J41102 ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
J43990 ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400
32557 ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC 400

32098 GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
J40972 GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
29213 GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
137483 GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
18879 GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
26285 GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
A.foetidus_CBS_56465 GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
A.tubigenis_CBS_134.48 GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
17_Innsbruck GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
15_Innsbruck GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
12_Innsbruck GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
11_Innsbruck GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
7_Innsbruck GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
6_Innsbruck GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
5_Innsbruck GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
3_Innsbruck GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
9914/10 GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
18318/10 GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
9755/10 GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
35329/09 GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
36873/09 GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
29784/09 GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
J33962/09 GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
18917/09 GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
J26753 GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
18515/09 GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
157/10 GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
J03790/10a GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
J05749/10 GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
J06089/10 GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
J08693/10 GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
6946/10 GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
17935/10 GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
18626/10 GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
J22697/10 GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
J23594/10 GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
1_Innsbruck GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
2_Innsbruck GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
4_Innsbruck GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
8_Innsbruck GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
9_Innsbruck GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
10_Innsbruck GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
14_Innsbruck GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
16_Innsbruck GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
A.niger_CBS_554.65 GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
J22248 GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
J141101 GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
J41102 GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
J43990 GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450
32557 GGGGGGACGGGCCCGAAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGC 450

32098 GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

J40972 GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

29213 GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

137483 GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

18879 GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

26285 GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

A.foetidus_CBS_56465 GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

A.tubigenis_CBS_134.48 GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

17_Innsbruck GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

15_Innsbruck GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

12_Innsbruck GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

11_Innsbruck GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

7_Innsbruck GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

6_Innsbruck GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

5_Innsbruck GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

3_Innsbruck GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

9914/10 GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

18318/10 GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

9755/10 GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

35329/09 GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

36873/09 GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

29784/09 GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

J33962/09 GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

18917/09 GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

J26753 GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

18515/09 GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

157/10 GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

J03790/10a GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

J05749/10 GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

J06089/10 GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

J08693/10 GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

6946/10 GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

17935/10 GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

18626/10 GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

J22697/10 GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

J23594/10 GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

1_Innsbruck GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

2_Innsbruck GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

4_Innsbruck GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

8_Innsbruck GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

9_Innsbruck GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

10_Innsbruck GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

14_Innsbruck GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

16_Innsbruck GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

A.niger_CBS_554.65 GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

J22248 GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

J141101 GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

J41102 GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

J43990 GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

32557 GTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG 500

32098 TTTTCCAACCATTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
J40972 TTTTCCAACCATTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
29213 TTTTCCAACCATTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
137483 TTTTCCAACCATTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
18879 TTTTCCAACCATTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
26285 TTTTCCAACCATTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
A.foetidus_CBS_56465 TTTTCCAACCATTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
A.tubigenis_CBS_134.48 TTTTCCAACCATTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
17_Innsbruck TTTTCCAACCATTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
15_Innsbruck TTTTCCAACCATTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
12_Innsbruck TTTTCCAACCATTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
11_Innsbruck TTTTCCAACCATTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
7_Innsbruck TTTTCCAACCATTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
6_Innsbruck TTTTCCAACCATTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
5_Innsbruck TTTTCCAACCATTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
3_Innsbruck TTTTCCAACCATTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
9914/10 TTTTCCAACCATTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
18318/10 TTTTCCAACCATTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
9755/10 TTTTCCAACCATTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
35329/09 TTTTCCAACCATTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
36873/09 TTTTCCAACCATTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
29784/09 TTTTCCAACCATTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
J33962/09 TTTTCCAACCATTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
18917/09 TTTTCCAACCATTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
J26753 TTTTCCAACCATTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
18515/09 TTTTCCAACCATTCTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
157/10 TTTTCCAACCATTCTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
J03790/10a TTTTCCAACCATTCTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
J05749/10 TTTTCCAACCATTCTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
J06089/10 TTTTCCAACCATTCTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
J08693/10 TTTTCCAACCATTCTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
6946/10 TTTTCCAACCATTCTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
17935/10 TTTTCCAACCATTCTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
18626/10 TTTTCCAACCATTCTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
J22697/10 TTTTCCAACCATTCTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
J23594/10 TTTTCCAACCATTCTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
1_Innsbruck TTTTCCAACCATTCTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
2_Innsbruck TTTTCCAACCATTCTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
4_Innsbruck TTTTCCAACCATTCTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
8_Innsbruck TTTTCCAACCATTCTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
9_Innsbruck TTTTCCAACCATTCTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
10_Innsbruck TTTTCCAACCATTCTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
14_Innsbruck TTTTCCAACCATTCTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
16_Innsbruck TTTTCCAACCATTCTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
A.niger_CBS_554.65 TTTTCCAACCATTCTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
J22248 TTTTCCAACCATTCTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
J141101 TTTTCCAACCATTCTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
J41102 TTTTCCAACCATTCTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
J43990 TTTTCCAACCATTCTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550
32557 TTTTCCAACCATTCTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 550

32098	CTGAACCTTAA	560
J40972	CTGAACCTTAA	560
29213	CTGAACCTTAA	560
137483	CTGAACCTTAA	560
18879	CTGAACCTTAA	560
26285	CTGAACCTTAA	560
A.foetidus_CBS_56465	CTGAACCTTAA	560
A.tubigenis_CBS_134.48	CTGAACCTTAA	560
17_Innsbruck	CTGAACCTTAA	560
15_Innsbruck	CTGAACCTTAA	560
12_Innsbruck	CTGAACCTTAA	560
11_Innsbruck	CTGAACCTTAA	560
7_Innsbruck	CTGAACCTTAA	560
6_Innsbruck	CTGAACCTTAA	560
5_Innsbruck	CTGAACCTTAA	560
3_Innsbruck	CTGAACCTTAA	560
9914/10	CTGAACCTTAA	560
18318/10	CTGAACCTTAA	560
9755/10	CTGAACCTTAA	560
35329/09	CTGAACCTTAA	560
36873/09	CTGAACCTTAA	560
29784/09	CTGAACCTTAA	560
J33962/09	CTGAACCTTAA	560
18917/09	CTGAACCTTAA	560
J26753	CTGAACCTTAA	560
18515/09	CTGAACCTTAA	560
157/10	CTGAACCTTAA	560
J03790/10a	CTGAACCTTAA	560
J05749/10	CTGAACCTTAA	560
J06089/10	CTGAACCTTAA	560
J08693/10	CTGAACCTTAA	560
6946/10	CTGAACCTTAA	560
17935/10	CTGAACCTTAA	560
18626/10	CTGAACCTTAA	560
J22697/10	CTGAACCTTAA	560
J23594/10	CTGAACCTTAA	560
1_Innsbruck	CTGAACCTTAA	560
2_Innsbruck	CTGAACCTTAA	560
4_Innsbruck	CTGAACCTTAA	560
8_Innsbruck	CTGAACCTTAA	560
9_Innsbruck	CTGAACCTTAA	560
10_Innsbruck	CTGAACCTTAA	560
14_Innsbruck	CTGAACCTTAA	560
16_Innsbruck	CTGAACCTTAA	560
A.niger_CBS_554.65	CTGAACCTTAA	560
J22248	CTGAACCTTAA	560
J141101	CTGAACCTTAA	560
J41102	CTGAACCTTAA	560
J43990	CTGAACCTTAA	560
32557	CTGAACCTTAA	560

β-Tubulin Gen

Da sich bei der ITS-Region keine Unterschiede für *Aspergillus foetidus* und *Aspergillus tubingensis* ergaben, wurde das β-Tubulin Gen für die Differenzierung verwendet. Zusätzlich ließen wir als Kontrollgruppen sechs *Aspergillus niger*-Stämme mitlaufen. Insgesamt ergaben sich sieben Basenunterschiede und somit konnte zwischen diesen beiden Aspergillen unterschieden werden (Alignement siehe unten).

Insgesamt zeigten sich 10 Nukleotidunterschiede zwischen *Aspergillus tubingensis* und *Aspergillus foetidus* (- 35 A, - 36 T, T 60 C, C 80 T, C 81 T, A 78 G, A 207 G, G 237 A, C 433 T, C 466 T)

Die folgenden Basen - 35 A, - 36 T, C 80 T, C 81 T, C 466 T, C 433 T, A 207 G zeigten eine unterschiedliche Basenabfolge sowohl in der *A. tubingensis*- als auch in der *Aspergillus niger*-Sequenz. *Aspergillus tubingensis* zeigte zusätzlich noch 31 Basenunterschiede (- 14 A, G 43 A, A 52 G, T 60 C, A 78 G, C 84 T, G 85 A, A 93 -, G(-) 103 T, T 104 C, C 123 T, A 78 G, T 214 G, G 216 C, A 222 G, T 229 C, C 231 T, G 237 A, T 305 G, A 311 -, C 314 T, T 317 G, C 318 A, G 322 T, A 323 G, T 325 C, G 354 A, C 388 T, C 391 T, T 409 C, C 458 T) zu den mitgelaufenen *Aspergillus niger*-Strängen.

Aspergillus foetidus wies zu *Aspergillus niger* insgesamt 34 Unterschiede auf. (- 14 A, A 35 -, T 36 -, A 43 G, A 52 G, A 78 G, T 80 C, T 81 C, C 84 T, G 85 A, A 93 -, G 103 T, T 104 C, C 123 T, G 207 A, T 214 G, G 216 C, A 222 G, T 229 C, C 231 T, T 305 G, A 311 -, C 314 T, T 317 G, C 318 A, G 322 T, A 323 G, T 325 C, G 354 A, C 388 T, C 391 T, T 433 C, C 458 T, T 466 C)

Alignment der β -Tubulin Sequenzen der untersuchten Pilzproben (Seite 47-56)

```

A.tubingensis_CBS_13448      TGGTACGTATTCA-CTGCCACTGGATTGGGGATGG--AACATCATCTCTC 47
9755/10_t                    TGGTACGTATTCA-CTGCCACTGGATTGGGGATGG--AACATCATCTCTC 47
29213/10                     TGGTACGTATTCA-CTGCCACTGGATTGGGGATGG--AACATCATCTCTC 47
36873/09_t                   TGGTACGTATTCA-CTGCCACTGGATTGGGGATGG--AACATCATCTCTC 47
6_Innsbruck_t               TGGTACGTATTCA-CTGCCACTGGATTGGGGAAAGG--AACATCATCTCTC 47
12_Innsbruck_t              TGGTACGTATTCA-CTGCCACTGGATTGGGGATGG--AACATCATCTCTC 47
17_Innsbruck_t              TGGTACGTATTCA-CTGCCACTGGATTGGTGATGG--AACATCATCTCTC 47
35329/09_t                   TGGTACGTATTCA-CTGCCACTGGATTGGGGATGG--AACATCATCTCTC 47
29784/09_t                   TGGTACGTATTCA-CTGCCACTGGATTGGGGATGG--AACATCATCTCTC 47
18318/10_t                  TGGTACGTATTCA-CTGCCACTGGATTGGGGATGG--AACATCATCTCTC 47
11_Innsbruck_t              TGGTACGTATTCA-CTGCCACTGGATTGGGGATGG--AACATCATCTCTC 47
32098/10                     TGGTACGTATTCA-CTGCCACTGGATTGGGGATGG--AACATCATCTCTC 47
9914/10_t                   TGGTACGTATTCA-CTGCCACTGGATTGGGGATGG--AACATCATCTCTC 47
15_Innsbruck_t              TGGTACGTATTCA-CTGCCACTGGATTGGGGATGG--AACATCATCTCTC 47
A.foetidus_CBS_56465        TGGTACGTATTCA-CTGCCACTGGATTGGGGATGGATAACATCATCTCTC 49
3_Innsbruck_f                TGGTACGTATTCA-CTGCCACTGGATTGGGGATGGATAACATCATCTCTC 49
5_Innsbruck_f                TGGTACGTATTCA-CTGCCACTGGATTGGGGATGGATAACATCATCTCTC 49
7_Innsbruck_f                TGGTACGTATTCA-CTGCCACTGGATTGGGGATGGATAACATCATCTCTC 49
J40972/10                    TGGTACGTATTCA-CTGCCACTGGATTGGGGATGGATAACATCATCTCTC 49
A.niger_CBS_554_65           TGGTACGTATACAAC TGCCGTTGGATTGGGGATGG--AACATCGTCTCTT 48
J05749/10_n                  TGGTACGTATACAAC TGCCGTTGGATTGGGGATGG--AACATCGTCTCTT 48
1_Innsbruck_n                TGGTACGTATACAAC TGCCGTTGGATTGGGGATGG--AACATCGTCTCTT 48
32557/10                     TGGTACGTATACAAC TGCCGTTGGATTGGGGATGG--AACATCGTCTCTT 48
J141101/10                   TGGTACGTATACAAC TGCCATTGGATTGGGGATGG--AACATCGTCTCTT 48
J41102/10                     TGGTACGTATACAAC TGCCATTGGATTGGGGATGG--AACATCGTCTCTT 48
*****:* * * * * . ***** **:* * * * * .*****

```

A. tubingensis vs *A. foetidus*: - 35 A, - 36 T

A. tubingensis vs *A. niger*: - 14 A, G 43 A

A. foetidus vs *A. niger*: - 14 A, A 35 -, T 36 -, A 43 G


```

A.tubingensis_CBS_13448      GGGTTAAGAACACCGTCTAACAACTCAACAGGCAGACCATCTCTGGCGAGC 147
9755/10_t                    GG-TTAAGAACACCGTCTAACAACTCAACAGGCAGACCATCTCTGGCGAGC 145
29213/10                     GG-TTAAGAACACCGTCTAACAACTCAACAGGCAGACCATCTCTGGCGAGC 145
36873/09_t                   GG-TTAAGAACACCGTCTAACAACTCAACAGGCAGACCATCTCTGGCGAGC 145
6_Innsbruck_t                GG-TTAAGAACACCGTCTAACAACTCAACAGGCAGACCATCTCTGGCGAGC 145
12_Innsbruck_t               GG-TTAAGAACACCGTCTAACAACTCAACAGGCAGACCATCTCTGGCGAGC 145
17_Innsbruck_t               GG-TTAAGAACACCGTCTAACAACTCAACAGGCAGACCATCTCTGGCGAGC 145
35329/09_t                   GG-TTAAGAACACCGTCTAACAACTCAACAGGCAGACCATCTCTGGCGAGC 145
29784/09_t                   GGGTTAAGAACACCGTCTAACAACTCAACAGGCAGACCATCTCTGGCGAGC 147
18318/10_t                   GGGTTAAGAACACCGTCTAACAACTCAACAGGCAGACCATCTCTGGCGAGC 147
11_Innsbruck_t               GGGTTAAGAACACCGTCTAACAACTCAACAGGCAGACCATCTCTGGCGAGC 147
32098/10                     GGGTTAAGAACACCGTCTAACAACTCAACAGGCAGACCATCTCTGGCGAGC 147
9914/10_t                    GGGTTAAGAACACCGTCTAACAACTCAACAGGCAGACCATCTCTGGCGAGC 147
15_Innsbruck_t               GGGTTAAGAACACCGTCTAACAACTCAACAGGCAGACCATCTCTGGCGAGC 147
A.foetidus_CBS_56465        GGGTTAAGAACACCGTCTAACAACTCAACAGGCAGACCATCTCTGGCGAGC 149
3_Innsbruck_f                GGGTTAAGAACACCGTCTAACAACTCAACAGGCAGACCATCTCTGGCGAGC 149
5_Innsbruck_f                GGGTTAAGAACACCGTCTAACAACTCAACAGGCAGACCATCTCTGGCGAGC 149
7_Innsbruck_f                GGGTTAAGAACACCGTCTAACAACTCAACAGGCAGACCATCTCTGGCGAGC 149
J40972/10                    GGGTTAAGAACACCGTCTAACAACTCAACAGGCAGACCATCTCTGGCGAGC 149
A.niger_CBS_554_65           GGTCTAAGAACACCGTCTAACAAATTC AACAGGCAGACCATCTCTGGCGAGC 147
J05749/10_n                  GGTCTAAGAACACCGTCTAACAAATTC AACAGGCAGACCATCTCTGGCGAGC 147
1_Innsbruck_n                GGTCTAAGAACACCGTCTAACAAATTC AACAGGCAGACCATCTCTGGCGAGC 147
32557/10                     GGTCTAAGAACACCGTCTAACAAATTC AACAGGCAGACCATCTCTGGCGAGC 147
J141101/10                   GGTCTAAGAACACCGTCTAACAAATTC AACAGGCAGACCATCTCTGGCGAGC 147
J41102/10                     GGTCTAAGAACACCGTCTAACAAATTC AACAGGCAGACCATCTCTGGCGAGC 147
** *****

```

***A. tubingensis* vs *A. foetidus*: keine Unterschiede**

***A. tubingensis* vs *A. niger*: G(-) 103 T, T 104 C, C 123 T**

***A. foetidus* vs *A. niger*: G 103 T, T 104 C, C 123 T**

```

A.tubingensis_CBS_13448      ACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAACCTTTTCACACCTCTCAA 197
9755/10_t                    ACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAACCTTTTCACACCTCTCAA 195
29213/10                     ACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAACCTTTTCACACCTCTCAA 195
36873/09_t                   ACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAACCTTTTCACACCTCTCAA 195
6_Innsbruck_t                ACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAACCTTTTCACACCTCTCAA 195
12_Innsbruck_t               ACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAACCTTTTCACACCTCTCAA 195
17_Innsbruck_t               ACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAACCTTTTCACACCTCTCAA 195
35329/09_t                   ACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAACCTTTTCACACCTCTCAA 195
29784/09_t                   ACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAACCTTTTCACACCTCTCAA 197
18318/10_t                   ACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAACCTTTTCACACCTCTCAA 197
11_Innsbruck_t               ACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAACCTTTTCACACCTCTCAA 197
32098/10                     ACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAACCTTTTCACACCTCTCAA 197
9914/10_t                    ACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAACCTTTTCACACCTCTCAA 197
15_Innsbruck_t               ACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAACCTTTTCACACCTCTCAA 197
A.foetidus_CBS_56465        ACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTGCAACTTTTTCACACCTCTCAA 199
3_Innsbruck_f                ACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTGCAACTTTTTCACACCTCTCAA 199
5_Innsbruck_f                ACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTGCAACTTTTTCACACCTCTCAA 199
7_Innsbruck_f                ACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTGCAACTTTTTCACACCTCTCAA 199
J40972/10                    ACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTGCAACTTTTTCACACCTCTCAA 199
A.niger_CBS_554_65           ACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTGCAACTTTTTCACACCTCTCAA 197
J05749/10_n                  ACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTGCAACTTTTTCACACCTCTCAA 197
1_Innsbruck_n                ACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTGCAACTTTTTCACACCTCTCAA 197
32557/10                     ACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTGCAACTTTTTCACACCTCTCAA 197
J141101/10                   ACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTGCAACTTTTTCACACCTCTCAA 197
J41102/10                     ACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTGCAACTTTTTCACACCTCTCAA 197
*****.*****

```

***A. tubingensis* vs *A. foetidus*: A 78 G**

***A. tubingensis* vs *A. niger*: A 78 G**

***A. foetidus* vs *A. niger*: keine Unterschiede**

*A. tubingensis*_CBS_13448 TTGGTCAACAATGTGGAAAGGATTGGGTTTCCTGACGCGCAGGATAGTTA 247
 9755/10_t TTGGTCAACAATGTGGAAAGGATTGGGTTTCCTGACGCGCAGGATAGTTA 245
 29213/10 TTGGTCAACAATGTGGAAAGGATTGGGTTTCCTGACGCGCAGGATAGTTA 245
 36873/09_t TTGGTCAACAATGTGGAAAGGATTGGGTTTCCTGACGCGCAGGATAGTTA 245
 6_Innsbruck_t TTGGTCAACAATGTGGAAAGGATTGGGTTTCCTGACGCGCAGGATAGTTA 245
 12_Innsbruck_t TTGGTCAACAATGTGGAAAGGATTGGGTTTCCTGACGCGCAGGATAGTTA 245
 17_Innsbruck_t TTGGTCAACAATGTGGAAAGGATTGGGTTTCCTGACGCGCAGGATAGTTA 245
 35329/09_t TTGGTCAACAATGTGGAAAGGATTGGGTTTCCTGACGCGCAGGATAGTTA 245
 29784/09_t TTGGTCAACAATGTGGAAAGGATTGGGTTTCCTGACGCGCAGGATAGTTA 247
 18318/10_t TTGGTCAACAATGTGGAAAGGATTGGGTTTCCTGACGCGCAGGATAGTTA 247
 11_Innsbruck_t TTGGTCAACAATGTGGAAAGGATTGGGTTTCCTGACGCGCAGGATAGTTA 247
 32098/10 TTGGTCAACAATGTGGAAAGGATTGGGTTTCCTGACGCGCAGGATAGTTA 247
 9914/10_t TTGGTCAACAATGTGGAAAGGATTGGGTTTCCTGACGCGCAGGATAGTTA 247
 15_Innsbruck_t TTGGTCAACAATGTGGAAAGGATTGGGTTTCCTGACGCGCAGGATAGTTA 247
*A. foetidus*_CBS_56465 TTGGTCGACAATGTGGAAAGGATTGGGTTTCCTGACACGCAGGATAGTTA 249
 3_Innsbruck_f TTGGTCGACAATGTGGAAAGGATTGGGTTTCCTGACACGCAGGATAGTTA 249
 5_Innsbruck_f TTGGTCGACAATGTGGAAAGGATTGGGTTTCCTGACACGCAGGATAGTTA 249
 7_Innsbruck_f TTGGTCGACAATGTGGAAAGGATTGGGTTTCCTGACACGCAGGATAGTTA 249
 J40972/10 TTGGTCGACAATGTGGAAAGGATTGGGTTTCCTGACACGCAGGATAGTTA 249
*A. niger*_CBS_554_65 TTGGTCAACAATGGGCAAAGGGTTGGGTCTTCTGACACGCAGGATAGTTA 247
 J05749/10_n TTGGTCAACAATGGGCAAAGGGTTGGGTCTTCTGACACGCAGGATAGTTA 247
 1_Innsbruck_n TTGGTCAACAATGGGCAAAGGGTTGGGTCTTCTGACACGCAGGATAGTTA 247
 32557/10 TTGGTCAACAATGGGCAAAGGGTTGGGTCTTCTGACACGCAGGATAGTTA 247
 J141101/10 TTGGTCAACAATGGGCAAAGGGTTGGGTCTTCTGACACGCAGGATAGTTA 247
 J41102/10 TTGGTCAACAATGGGCAAAGGGTTGGGTCTTCTGACACGCAGGATAGTTA 247
 *****_***** * *****_****_* * *****_*****

A. tubingensis vs *A. foetidus*: A 207 G, G 237 A

A. tubingensis vs *A. niger*: T 214 G, G 216 C, A 222 G, T 229 C, C 231 T, G 237 A

A. foetidus vs *A. niger*: G 207 A, T 214 G, G 216 C, A 222 G, T 229 C, C 231 T

A.tubingensis_CBS_13448 CAATGGCACCTCCGACCTCCAGCTGGAGCGCATGAACGTCTACTTCAACG 297
9755/10_t CAATGGCACCTCCGACCTCCAGCTGGAGCGCATGAACGTCTACTTCAACG 295
29213/10 CAATGGCACCTCCGACCTCCAGCTGGAGCGCATGAACGTCTACTTCAACG 295
36873/09_t CAATGGCACCTCCGACCTCCAGCTGGAGCGCATGAACGTCTACTTCAACG 295
6_Innsbruck_t CAATGGCACCTCCGACCTCCAGCTGGAGCGCATGAACGTCTACTTCAACG 295
12_Innsbruck_t CAATGGCACCTCCGACCTCCAGCTGGAGCGCATGAACGTCTACTTCAACG 295
17_Innsbruck_t CAATGGCACCTCCGACCTCCAGCTGGAGCGCATGAACGTCTACTTCAACG 295
35329/09_t CAATGGCACCTCCGACCTCCAGCTGGAGCGCATGAACGTCTACTTCAACG 295
29784/09_t CAATGGCACCTCCGACCTCCAGCTGGAGCGCATGAACGTCTACTTCAACG 297
18318/10_t CAATGGCACCTCCGACCTCCAGCTGGAGCGCATGAACGTCTACTTCAACG 297
11_Innsbruck_t CAATGGCACCTCCGACCTCCAGCTGGAGCGCATGAACGTCTACTTCAACG 297
32098/10 CAATGGCACCTCCGACCTCCAGCTGGAGCGCATGAACGTCTACTTCAACG 297
9914/10_t CAATGGCACCTCCGACCTCCAGCTGGAGCGCATGAACGTCTACTTCAACG 297
15_Innsbruck_t CAATGGCACCTCCGACCTCCAGCTGGAGCGCATGAACGTCTACTTCAACG 297
A.foetidus_CBS_56465 CAATGGCACCTCCGACCTCCAGCTGGAGCGCATGAACGTCTACTTCAACG 299
3_Innsbruck_f CAATGGCACCTCCGACCTCCAGCTGGAGCGCATGAACGTCTACTTCAACG 299
5_Innsbruck_f CAATGGCACCTCCGACCTCCAGCTGGAGCGCATGAACGTCTACTTCAACG 299
7_Innsbruck_f CAATGGCACCTCCGACCTCCAGCTGGAGCGCATGAACGTCTACTTCAACG 299
J40972/10 CAATGGCACCTCCGACCTCCAGCTGGAGCGCATGAACGTCTACTTCAACG 299
A.niger_CBS_554_65 CAATGGCACCTCCGACCTCCAGCTGGAGCGCATGAACGTCTACTTCAACG 297
J05749/10_n CAATGGCACCTCCGACCTCCAGCTGGAGCGCATGAACGTCTACTTCAACG 297
1_Innsbruck_n CAATGGCACCTCCGACCTCCAGCTGGAGCGCATGAACGTCTACTTCAACG 297
32557/10 CAATGGCACCTCCGACCTCCAGCTGGAGCGCATGAACGTCTACTTCAACG 297
J141101/10 CAATGGCACCTCCGACCTCCAGCTGGAGCGCATGAACGTCTACTTCAACG 297
J41102/10 CAATGGCACCTCCGACCTCCAGCTGGAGCGCATGAACGTCTACTTCAACG 297

```

A.tubingensis_CBS_13448      AGGTTAGATCACACCGTCCCTGAGTTTTTTCACGACAATATCATCAATGT 347
9755/10_t                    AGGTTAGATCACACCGTCCCTGAGTTTTTTCACGACAATATCATCAATGT 345
29213/10                     AGGTTAGATCACACCGTCCCTGAGTTTTTTCACGACAATATCATCAATGT 345
36873/09_t                   AGGTTAGATCACACCGTCCCTGAGTTTTTTCACGACAATATCATCAATGT 345
6_Innsbruck_t               AGGTTAGATCACACCGTCCCTGAGTTTTTTCACGACAATATCATCAATGT 345
12_Innsbruck_t              AGGTTAGATCACACCGTCCCTGAGTTTTTTCACGACAATATCATCAATGT 345
17_Innsbruck_t              AGGTTAGATCACACCGTCCCTGAGTTTTTTCACGACAATATCATCAATGT 345
35329/09_t                  AGGTTAGATCACACCGTCCCTGAGTTTTTTCACGACAATATCATCAATGT 345
29784/09_t                  AGGTTAGATCACACCGTCCCTGAGTTTTTTCACGACAATATCATCAATGT 347
18318/10_t                  AGGTTAGATCACACCGTCCCTGAGTTTTTTCACGACAATATCATCAATGT 347
11_Innsbruck_t              AGGTTAGATCACACCGTCCCTGAGTTTTTTCACGACAATATCATCAATGT 347
32098/10                    AGGTTAGATCACACCGTCCCTGAGTTTTTTCACGACAATATCATCAATGT 347
9914/10_t                   AGGTTAGATCACACCGTCCCTGAGTTTTTTCACGACAATATCATCAATGT 347
15_Innsbruck_t              AGGTTAGATCACACCGTCCCTGAGTTTTTTCACGACAATATCATCAATGT 347
A.foetidus_CBS_56465       AGGTTAGATCACACCGTCCCTGAGTTTTTTCACGACAATATCATCAATGT 349
3_Innsbruck_f                AGGTTAGATCACACCGTCCCTGAGTTTTTTCACGACAATATCATCAATGT 349
5_Innsbruck_f                AGGTTAGATCACACCGTCCCTGAGTTTTTTCACGACAATATCATCAATGT 349
7_Innsbruck_f                AGGTTAGATCACACCGTCCCTGAGTTTTTTCACGACAATATCATCAATGT 349
J40972/10                   AGGTTAGATCACACCGTCCCTGAGTTTTTTCACGACAATATCATCAATGT 349
A.niger_CBS_554_65          AGGTGAGATC-CATCGGACCTTGGCTTTTTCACGACAATATCATCAATGT 346
J05749/10_n                 AGGTGAGATC-CATCGGACCTTGGCTTTTACACGACAATATCATCAATGT 346
1_Innsbruck_n                AGGTGAGATC-CATCGGACCTTGGCTTTTACACGACAATATCATCAATGT 346
32557/10                    AGGTGAGATC-CATCGGACCTTGGCTTTTTCACGACAATATCATCAATGT 346
J141101/10                  AGGTGAGATC-CATCGGACCTTGGCTTTTTCACGACAATATCATCAATGT 346
J41102/10                    AGGTGAGATC-CATCGGACCTTGGCTTTTTCACGACAATATCATCAATGT 346
**** ***** ** ** .*** .* *****:*****

```

***A. tubingensis* vs *A. foetidus*: keine Unterschiede**

***A. tubingensis* vs *A. niger*: T 305 G, A 311 -, C 314 T, T 317 G, C 318 A, G 322 T, A 323 G, T 325 C**

***A. foetidus* vs *A. niger*: T 305 G, A 311 -, C 314 T, T 317 G, C 318 A, G 322 T, A 323 G, T 325 C**

```

A.tubingensis_CBS_13448      CCTGACCACTTCAGCAGGCTAGCGGTAACAAGTATGTCCCCCGTGCCGTC 397
9755/10_t                    CCTGACCACTTCAGCAGGCTAGCGGTAACAAGTATGTCCCCCGTGCCGTC 395
29213/10                     CCTGACCACTTCAGCAGGCTAGCGGTAACAAGTATGTCCCCCGTGCCGTC 395
36873/09_t                   CCTGACCACTTCAGCAGGCTAGCGGTAACAAGTATGTCCCCCGTGCCGTC 395
6_Innsbruck_t               CCTGACCACTTCAGCAGGCTAGCGGTAACAAGTATGTCCCCCGTGCCGTC 395
12_Innsbruck_t              CCTGACCACTTCAGCAGGCTAGCGGTAACAAGTATGTCCCCCGTGCCGTC 395
17_Innsbruck_t              CCTGACCACTTCAGCAGGCTAGCGGTAACAAGTATGTCCCCCGTGCCGTC 395
35329/09_t                   CCTGACCACTTCAGCAGGCTAGCGGTAACAAGTATGTCCCCCGTGCCGTC 395
29784/09_t                   CCTGACCACTTCAGCAGGCTAGCGGTAACAAGTATGTCCCCCGTGCCGTC 397
18318/10_t                  CCTGACCACTTCAGCAGGCTAGCGGTAACAAGTATGTCCCCCGTGCCGTC 397
11_Innsbruck_t              CCTGACCACTTCAGCAGGCTAGCGGTAACAAGTATGTCCCCCGTGCCGTC 397
32098/10                     CCTGACCACTTCAGCAGGCTAGCGGTAACAAGTATGTCCCCCGTGCCGTC 397
9914/10_t                   CCTGACCACTTCAGCAGGCTAGCGGTAACAAGTATGTCCCCCGTGCCGTC 397
15_Innsbruck_t              CCTGACCACTTCAGCAGGCTAGCGGTAACAAGTATGTCCCCCGTGCCGTC 397
A.foetidus_CBS_56465       CCTGACCACTTCAGCAGGCTAGCGGTAACAAGTATGTCCCCCGTGCCGTC 399
3_Innsbruck_f               CCTGACCACTTCAGCAGGCTAGCGGTAACAAGTATGTCCCCCGTGCCGTC 399
5_Innsbruck_f               CCTGACCACTTCAGCAGGCTAGCGGTAACAAGTATGTCCCCCGTGCCGTC 399
7_Innsbruck_f               CCTGACCACTTCAGCAGGCTAGCGGTAACAAGTATGTCCCCCGTGCCGTC 399
J40972/10                   CCTGACCACTTCAGCAGGCTAGCGGTAACAAGTATGTCCCCCGTGCCGTC 399
A.niger_CBS_554_65          CCTAATCACCTTCAGCAGGCTAGCGGTAACAAGTATGTTCCCTCGTGCCGTC 396
J05749/10_n                 CCTAATCACCTTCAGCAGGCTAGCGGTAACAAGTATGTTCCCTCGTGCCGTC 396
1_Innsbruck_n               CCTAATCACCTTCAGCAGGCTAGCGGTAACAAGTATGTTCCCTCGTGCCGTC 396
32557/10                    CCTAATCACCTTCAGCAGGCTAGCGGTAACAAGTATGTTCCCTCGTGCCGTC 396
J141101/10                  CCTAATCACCTTCAGCAGGCTAGCGGTAACAAGTATGTTCCCTCGTGCCGTC 396
J41102/10                    CCTAATCACCTTCAGCAGGCTAGCGGTAACAAGTATGTTCCCTCGTGCCGTC 396
***_* ***** ** *****

```

***A. tubingensis* vs *A. foetidus*: keine Unterschiede**

***A. tubingensis* vs *A. niger*: G 354 A, C 388 T, C 391 T**

***A. foetidus* vs *A. niger*: G 354 A, C 388 T, C 391 T**

A.tubingensis_CBS_13448	CTCGTCGATCTCGAGCCCAGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTT	447
9755/10_t	CTCGTCGATCTCGAGCCCAGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTT	445
29213/10	CTCGTCGATCTCGAGCCCAGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTT	445
36873/09_t	CTCGTCGATCTCGAGCCCAGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTT	445
6_Innsbruck_t	CTCGTCGATCTCGAGCCCAGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTT	445
12_Innsbruck_t	CTCGTCGATCTCGAGCCCAGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTT	445
17_Innsbruck_t	CTCGTCGATCTCGAGCCCAGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTT	445
35329/09_t	CTCGTCGATCTCGAGCCCAGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTT	445
29784/09_t	CTCGTCGATCTCGAGCCCAGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTT	447
18318/10_t	CTCGTCGATCTCGAGCCCAGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTT	447
11_Innsbruck_t	CTCGTCGATCTCGAGCCCAGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTT	447
32098/10	CTCGTCGATCTCGAGCCCAGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTT	447
9914/10_t	CTCGTCGATCTCGAGCCCAGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTT	447
15_Innsbruck_t	CTCGTCGATCTCGAGCCCAGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTT	447
A.foetidus_CBS_56465	CTCGTCGATCTCGAGCCCAGTACCATGGACGCTGTCCGTGCCGGTCCCTT	449
3_Innsbruck_f	CTCGTCGATCTCGAGCCCAGTACCATGGACGCTGTCCGTGCCGGTCCCTT	449
5_Innsbruck_f	CTCGTCGATCTCGAGCCCAGTACCATGGACGCTGTCCGTGCCGGTCCCTT	449
7_Innsbruck_f	CTCGTCGATCTCGAGCCCAGTACCATGGACGCTGTCCGTGCCGGTCCCTT	449
J40972/10	CTCGTCGATCTCGAGCCCAGTACCATGGACGCTGTCCGTGCCGGTCCCTT	449
A.niger_CBS_554_65	CTCGTCGACCTCGAGCCCAGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTT	446
J05749/10_n	CTCGTCGACCTCGAGCCCAGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTT	446
1_Innsbruck_n	CTCGTCGACCTCGAGCCCAGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTT	446
32557/10	CTCGTCGACCTCGAGCCCAGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTT	446
J141101/10	CTCGTCGACCTCGAGCCCAGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTT	446
J41102/10	CTCGTCGACCTCGAGCCCAGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTT	446

***** ***** **

A. tubingensis vs *A. foetidus*: C 433 T

A. tubingensis vs *A. niger*: T 409 C, C 458 T

A. foetidus vs *A. niger*: T 433 C, C 458 T

```

A.tubingensis_CBS_13448      CGGCCAGCTCTCCGCCCCGACAAC TTCGTCTTCGGCCAGTCCGGT 493
9755/10_t                    CGGCCAGCTCTCCGCCCCGACAAC TTCGTCTTCGGCCAGTCCGGT 491
29213/10                     CGGCCAGCTCTCCGCCCCGACAAC TTCGTCTTCGGCCAGTCCGGT 491
36873/09_t                   CGGCCAGCTCTCCGCCCCGACAAC TTCGTCTTCGGCCAGTCCGGT 491
6_Innsbruck_t                CGGCCAGCTCTCCGCCCCGACAAC TTCGTCTTCGGCCAGTCCGGT 491
12_Innsbruck_t               CGGCCAGCTCTCCGCCCCGACAAC TTCGTCTTCGGCCAGTCCGGT 491
17_Innsbruck_t               CGGCCAGCTCTCCGCCCCGACAAC TTCGTCTTCGGCCAGTCCGGT 491
35329/09_t                   CGGCCAGCTCTCCGCCCCGACAAC TTCGTCTTCGGCCAGTCCGGT 491
29784/09_t                   CGGCCAGCTCTCCGCCCCGACAAC TTCGTCTTCGGCCAGTCCGGT 493
18318/10_t                   CGGCCAGCTCTCCGCCCCGACAAC TTCGTCTTCGGCCAGTCCGGT 493
11_Innsbruck_t               CGGCCAGCTCTCCGCCCCGACAAC TTCGTCTTCGGCCAGTCCGGT 493
32098/10                     CGGCCAGCTCTCCGCCCCGACAAC TTCGTCTTCGGCCAGTCCGGT 493
9914/10_t                    CGGCCAACTCTCCGCCCCGACAAC TTCGTCTTCGGCCAGTCCGGT 493
15_Innsbruck_t               CGGCCAGCTCTCCGCCCCGACAAC TTCGTCTTCGGCCAGTCCGGT 493
A.foetidus_CBS_56465        CGGCCAGCTCTCCGTCCCGACAAC TTCGTCTTCGGCCAGTCCGGT 495
3_Innsbruck_f                CGGCCAGCTCTCCGTCCCGACAAC TTCGTCTTCGGCCAGTCCGGT 495
5_Innsbruck_f                CGGCCAGCTCTCCGTCCCGACAAC TTCGTCTTCGGCCAGTCCGGT 495
7_Innsbruck_f                CGGCCAGCTCTCCGTCCCGACAAC TTCGTCTTCGGCCAGTCCGGT 495
J40972/10                    CGGCCAGCTCTCCGTCCCGACAAC TTCGTCTTCGGCCAGTCCGGT 495
A.niger_CBS_554_65           CGGCCAGCTCTCCGCCCCGACAAC TTCGTCTTCGGCCAGTCCGGT 492
J05749/10_n                  CGGCCAGCTCTCCGCCCCGACAAC TTCGTCTTCGGCCAGTCCGGT 492
1_Innsbruck_n                CGGCCAGCTCTCCGCCCCGACAAC TTCGTCTTCGGCCAGTCCGGT 492
32557/10                     CGGCCAGCTCTCCGCCCCGACAAC TTCGTCTTCGGCCAGTCCGGT 492
J141101/10                   CGGCCAGCTCTCCGCCCCGACAAC TTCGTCTTCGGCCAGTCCGGT 492
J41102/10                     CGGCCAGCTCTCCGCCCCGACAAC TTCGTCTTCGGCCAGTCCGGT 492
*****_***** ***** *

```

A. tubingensis vs *A. foetidus*: C 466 T

A. tubingensis vs *A. niger*: keine Unterschiede

A. foetidus vs *A. niger*: T 466 C

n = 46		
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus tubingensis</i>	<i>Aspergillus foetidus</i>
25 (54%)	17 (37%)	4 (9%)

Tabelle 2: Spektrum der identifizierten Pilze

3.3 Krankenakten

Bei 15 Patienten wurde, neben der exakten molekularbiologischen Identifizierung, der Pilzbefund retrospektiv klinischen Befunden gegenübergestellt. Die Daten entstammen vom klinischen Kommunikations- und Informationsnetzwerk MEDOCS.

Tabelle 3: Krankenakten-Tabelle Teil 1

	Alter	Geschlecht	Ohr re/li	Primärkrankheit/ Erstdiagnose	Symptome	Diagnose im Verlauf	Bakteriologie
18515	38	weiblich	li	Otitis media sin	Otalgie, Völlegefühl	Otitis externa sin nach anbehandelter Otitis media	o.B.
18917	39	weiblich	li + re	eitrige Otitis media bds.	Otalgie, Otorrhoe, später Juckreiz	Otitis externa exzerbiziert, Otomykose	o.B.
26285	20	weiblich	re	Otitis externa	Otalgie, eingeschränktes Hören, Otorrhoe	Otitis externa prolongata, Otomykose	<i>Koagulase neg. Staphylokokken</i>
35329	37	weiblich	re	Otitis externa rechts (Otomykose)	Otalgie, Jucken, infraauriculärer Druckschmerz	Otitis externa rechts (Otomykose)	o.B.
36873	49	weiblich	re + li	Otitis externa	Otalgie, Tragusdruckschmerz, Jucken	Otomykose	<i>Koagulase negative Staphylokokken, Enterococcus sp, Staphylococcus aureus</i>
157	57	männlich	li	Otomykose	Otalgia, eingeschränktes Hören	Otomykose	o.B.
6946	9	männlich	re	Otitis media mit Gehörgangsmykose	Otorrhoe		<i>Klebsiella oxytoca</i>
9755	59	männlich	re	rezidivierende Otitis media u. externa rechts		Otitis media + Otomykose	<i>Staphylococcus aureus, Enterococcus sp, Corynebakterium sp</i>
17935	13	männlich	re	Otitis ext. dext.	Otalgia, Völlegefühl, Tragusdruckschmerz, eingeschränktes Hören, später Otorrhoe	Otitis externa dext (<i>E.coli</i> + <i>A. niger</i>), Myringitis eventuell Pilz bedingt	<i>Escherichia coli</i>
18318	65	weiblich	li	protrahierte Otitis media/ Cholesteatom links	Otalgie	Cholesteatom	o.B.
18626	52	männlich	li	Cerumenobturation	Otalgie, hartes Cerumen		<i>Enterobacter cloacae, Enterococcus faecalis</i>
18879	67	weiblich	re	Otomykose	eingeschränktes Hören, Otorrhoe		o.B.
29213	77	weiblich	li	infizierte Radikalhöhle	feuchte Radikalhöhle, Otorrhoe		<i>Serratia liqifaciens</i>
32557	27	weiblich	li	Otitis externa links (v.a. Mykose), Otitis media links	Otalgie, eingeschränktes Hören, Völlegefühl		<i>Staphylococcus aureus</i>
32098	52	weiblich	li	Otitis media sin perforiert	Otalgie, Otorrhoe, druckschmerzhafte Lymphknoten, Juckreiz	weitere Otitis externa sin protrahiert	<i>Koagulase negative Staphylokokken</i>

Tabelle 4: Krankenakten-Tabelle Teil 2 (1/2)

	Vorbehandlung	Pilz	Therapie der Otomykose	Anamnese
18515	Ciprofloxacin oral und Ciprofloxacin Ohrentropfen, Metamizol, Mefenaminsäure, Seractil® (Dexibuprofen), Betnesol® (Betamethason)	<i>A. niger</i>	H ₂ O ₂ , Verordnung für Duschtobplastik ausgestellt, Fernhalten v. Schmutz und H ₂ O neuerlich erklärt	Nicht erhebbar
18917	Amoxicillin und Clavulansäure oral, Xylometazolin Nasentropfen, Streifen mit Chlortetrazyklin und Burow Alkohol, Diclofenac, Metamizol	<i>A. tubingensis</i>	Reinigung, Streifen mit Chlortetrazyklin und Clotrimazol Lösung, Otowick bds. Clotrimazol Lösung auftropfen, Betamethason	Nicht erhebbar
26285	Ciprofloxacin lokal, Dexibuprofen, Cefixim oral	<i>A. tubingensis</i>	Econazol Hautmilch	Nicht erhebbar
35329	Keine Vorbehandlung	<i>A. tubingensis</i>	Clotrimazol Lösung; Mefenaminsäure	Nicht erhebbar
36873	Xomed Röhrchen mit Chlortetrazyklin und Burow Alkohol, Dexibuprofen, Burow Alkohol mehrmals täglich, absaugen Ciprofloxacin, Ciprofloxacin Ohrentropfen, touchieren mit Octenidin	<i>A. tubingensis</i>	Absaugen, Trockenhalten, 5% Acetum acetikum, Trockenhalten, Clotrimazol Lösung, Gehörgangspflege mit gereinigten Oliventropfen	Nicht erhebbar
157	Keine Vorbehandlung	<i>A. niger</i>	Streifen mit Clotrimazol, Clotrimazol Lösung, Diclofenac, Reinigung, Octenidin Wattetriller, trockenföhnen	Nicht erhebbar
6946	Keine Vorbehandlung	<i>A. niger</i>	Amoxicillin+ Clavulansäure, Xylometazolin Nasentropfen, Otowickröhrchen mit Clotrimazol Lösung gereinigt, Touchierung mit Acetum acetikum, Ciprofloxacin Ohrentropfen, Trockenföhnen, Desinfektion mit Octenidin	Gehörgangs-abszess re. vor 2 Jahren
9755	antibiotische Therapie	<i>A. tubingensis</i>	Streifen mit Econazol Creme	Immunsuppression
17935	Reinigung, Betamethason Tropfen, Xomed-Stift, Diclofenac, Burrow Alkohol	<i>A. niger</i>	Ciprofloxacin Ohrentropfen abwechselnd mit Clotrimazol Lösung, Diclofenac, Reinigung mit Chlortetrazyklin Salbe und Burrow Alkohol, BetamethasonTropfen	Nicht erhebbar

Krankenakten-Tabelle Teil 2 (2/2)

	Vorbehandlung	Pilz	Therapie der Otomykose	Anamnese
18318	oraler Ciprofloxacintherapie, Ciprofloxacin Ohrentropfen abwechselnd mit Betametason Tropfen, Diclofenac, Reinigung, operative Sanierung (Tympanoplastik) mit Bildung einer Radikalhöhle	<i>A. tubingensis</i> + <i>Candida parapsilosis</i>	keine spezifische antimykotische Therapie	Gaumen-spalten OP
18626	Cerustop Öl und Reinigung, Trockenhalten des Gehörgangs, Reinigung mit Octenidin touchiert	<i>A. niger</i>	keine spezifische antimykotische Therapie	Dermatophyten
18879	Keine Vorbehandlung	<i>A. tubingensis</i>	Clotrimazol Lösung, nach Applikation Trockenföhnen, Gabe von Betnesol, Parkemed, Schmutz und Wasser sind vom Ohr fernzuhalten, Clotrimazol Streifen zusätzlich Zinnat, Reinigung des Gehörgangs mit Absaugen und Octensisept Wattedriller	Nicht erhebbar
29213	feuchte Radikalhöhle, Betamethason Therapie und Trockenföhnen, Reinigung, Ciprofloxacin Ohrentropfen	<i>A. tubingensis</i>	Clotrimazol Lösung, stationäre Aufnahme zur intensiven Lokalthherapie war in Überlegung, Ohr regelmäßig trockenföhnen	Cholesteatom links, Attikoantrotomie
32557	Keine Vorbehandlung	<i>A. niger</i>	Amoxicillin + Clavulansäure, Oxymetazolin Nasentropfen, Diclofenac unter Ulcusprophylaxe (Esomeprazol), Clotrimazol Lösung, statt Clotrimazol Econazol Hautmilch, Ciprofloxacin Ohrentropfen und Clotrimazol Lösung, das Ohr Trockenföhnen, Ciprofloxacin oral, Schmutz vom Ohr fernhalten	Nicht erhebbar
32098	Ohrspülung, dann Neomycin sowie Dimetinden und Acetylcystein, Amoxicillin + Clavulansäure, Dimetinden Tropfen, Coldargan® Tropfen, Mefenaminsäure, Ciprofloxacin Ohrentropfen, Betahistin	<i>A. niger</i>	Xomed mit Chlortetrazyklin- Salbe und Burow Alkohol, Gentamycin Salbe für Ohrmuschel, Clotrimazol, Cerustop Öl gegen Juckreiz	Nicht erhebbar

Tabelle 5: Befunde der Ohrmikroskopien (1/2)

	OM1	OM2	OM3	OM4	OM5
18515	gerötete Gehörgangshinterwand, geringgradige Beläge				
18917	in beiden GG massive Otits externa, re.: komplett obliteriert, li.: massiv schuppiges eitriges Sekret abgesaugt, dahinter leicht gerötetes Trommelfell angesprochen auf Augmentin + Nasentropfen	re.: putrides Sekret, weißer Pilzrasen schollig belegt, links idem	GG gerötet, schollig belegte Membran, Pilzrasen an Membran	weißlich gelbes Sekret vor allem Membran nahe, oberflächlich entzündliche Defekte im Bereich des Trommelfells rechts, aber intakt	
26285	weißlich gelblich schleimiger Pfropf, nach Entfernung etwas vulnerabel entzündet	nach einem Monat: weißliches Sekret abgesaugt, GG leicht gerötet, Trommelfell bland			
35329	massiv trübes dickes Sekret mit Pilzhyphen, vermischt mit Cerumen; Membran dahinter etwas eingezogen, leicht gerötet				
36873	GG Vorderwand deutlich geschwollen und entdifferenziert	GG abgeschwollen, Detritus auf Membran, darauf deutliche Pilzabsiedelung auf der Membran, nach Absaugen des Detritus gerötete GGwand, Membran noch gerötet, Perforation im hinteren Quadranten; Mittelohrschleimhaut dahinter bland	re.: weißlich gelbe Massen, leichte Rötung des GG, Ohr li.: auch massiv schmieriger auch geschwärtzter Belag ersichtlich, gereinigt Membran dahinter leicht entzündet	massive Pilzbeläge, beide GG stark gerötet und geschwollen; linke Conchae beidseits ekzematös verändert; Progenta Salbe	
157	Pilzmycel im GG	deutlicher Pilzrasen, nach Absaugen blande GGwand			
6946	GG mit Pilzhyphen ausgefüllt, nach Reinigung GG mazeriert, Membran entdifferenziert und sezernierend	Detritus	weißlicher Detritus, GG leicht gerötet	Detritus mit vereinzelt dunklen Einlagerungen	
9755	re.: GG von Pilzmassen ausgefüllt, GG mazeriert und aufgelockert, Membran verdickt nur etwas sezernierend, geschlossen				
17935	Trommelfell nicht einsehbar, GG normal angelegt, re.: GG geschwollen, gerötet, Trommelfell bland	zwei Wochen später: GG zu 2/3 geschwollen, Detritus abgesaugt	GG aufgelockert, eitriges Sekret, Trommelfell lokal granulierend	GG deutlich gerötet, sichtbare Pilzhyphen im GG und an Membran	GG vulnerabel, massiv Detritus, schwärzliche Veränderungen
18318	GG voller Sekret, massiv weißlicher Detritus, GG geschwollen, Membran pulsierend	ausgedehntes Cholesteatom mit eitriger Sekretion	Watte im Gehörgang entdeckt, massiv weißlicher Detritus eine Woche vor der Operation		
18626	Cerumen beidseits, li.: hartes Cerumen, Reinigung schmerzbedingt nicht möglich	Restcerumen entfernt, li: schlitzförmige Perforation	li.: watteartiger Fremdkörper entfernt mit schwärzlicher Auflagerung, Membran scheint wieder geschlossen zu sein	freier Gehörgang, membran nahe etwas Cerumenauflagerung, leicht gerötete Vorwölbung unterer Quadrant	

Befunde der Ohrmikroskopien (2/2)

	OM1	OM2	OM3	OM4	OM5
18879	re.: massiv weißlich, bräunliches Sekret mit vereinzelt Pilzhyphen, membranernahe noch etwas Sekret vorhanden	Pilzbelag, dahinter infizierte nekrotische Gehörgangshaut, GG sehr gerötet, Trommelfell schollig belegt	neuerlich Pilzmassen, Membran entdifferenziert und belegt		
29213	GGeingangsbereich mit bräunlichem Sekret verschmiert, im GG erhebliche Massen an Detritus bräunlich weißlich gefärbt, nach Reinigung Sickerblutung, Perforationsstelle im vorderen unteren Bereich mit Granulationsgewebe	schuppig belegte verdickte Membran, Absaugen von weißlichen und bräunlichem Sekret	dickes weißes Sekret, gerötete Membran, Perforation im oberen Quadranten	Pilzrasen am Trommelfell, sehr viel Zelldetritus im GG und Eingang	Diskrete Auflagerungen am GGboden, Trommelfellperforation ist bland, Mittelohr diskret gerötet
32557	stark geschwollener GG schmierig belegt, GG gerötet, Pilzhyphen sichtbar, Membran gerötet entdifferenziert	Pilzrasen, GG bland, Membran leicht gerötet	schwarzer Pilzrasen, aufsteigend trübes Sekret aus Mittelohr	GG leicht gerötet	
32098	enger GG, Absaugen von weißlich gelbem Sekret, Membran schmierig belegt reizfrei	Zelldetritus, matt schuppig belegte Membran	nach Absaugen von Zelldetritus und Reinigung mit Octenisept zeigt sich eine mazerierte GG Wand	noch immer mazeriert, mäßig geschwollen	

3.4 Statistische Auswertung der demographischen Daten aller positiven Pilzbefunde aus dem Ohr (2006-2010)

Die statistische Auswertung aller positiven Pilzbefunde aus dem Ohr im Zeitraum von 2006 bis 2010 aus dem mykologischen Labor des Instituts für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin zeigte 425 positive Pilzbefunde bei 360 Patienten. Insgesamt wurden 478 Pilze gefunden, was auf ein mehrmaliges Erscheinen einzelner Patienten/innen sowie das Vorhandensein von Misch- bzw. Mehrfachbefunden zurückzuführen ist. Unter den gefundenen Pilzen befanden sich 28 verschiedene Arten. Die *Candida parapsilosis* war in unserer Auswertung am häufigsten im Gehörgang zu finden, gefolgt von *A. niger sensu lato*. (Tabelle 6, Abbildung 10 und 11)

Tabelle 6: Pilzspektrum (2006-2010)

Keimname	Anzahl/Keimname	% bezogen auf Anzahl/Keimname
<i>Candida parapsilosis</i>	139	29,08%
<i>Aspergillus niger</i>	97	20,29%
<i>Aspergillus fumigatus</i>	85	17,78%
<i>Candida albicans</i>	83	17,36%
<i>Aspergillus flavus</i>	23	4,81%
<i>Pseudallescheria boydii</i>	7	1,46%
<i>Candida glabrata</i>	6	1,26%
<i>Candida lusitanae (Clavispora lusitanae)</i>	4	0,84%
Sprosspilze	3	0,63%
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	3	0,63%
<i>Aspergillus candidus</i>	3	0,63%
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	2	0,42%
<i>Candida non-albicans</i>	2	0,42%
<i>Candida guilliermondii (Pichia guilliermondii)</i>	2	0,42%
<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	2	0,42%
Steriles Myzel	1	0,21%
<i>Scopulariopsis sp.</i>	1	0,21%
<i>Scedosporium apiospermum</i>	1	0,21%
<i>Paecilomyces sp.</i>	1	0,21%
<i>Microsporium canis</i>	1	0,21%
<i>Exophiala dermatitidis</i>	1	0,21%
<i>Chrysosporium queenslandicum</i>	1	0,21%
<i>Candida utilis</i>	1	0,21%
<i>Candida tropicalis</i>	1	0,21%
<i>Candida magnoliae</i>	1	0,21%
<i>Candida famata</i>	1	0,21%
<i>Candida ciferrii (Stephanoascus ciferrii)</i>	1	0,21%
<i>Aspergillus terreus</i>	1	0,21%
<i>Aspergillus sydowii</i>	1	0,21%
<i>Aspergillus sp.</i>	1	0,21%
<i>Aspergillus oryzae</i>	1	0,21%
<i>Aspergillus glaucus</i>	1	0,21%
Total	478	100%

Fadenpilze (n = 233) vs. Sprosspilze (n = 245)
(n = 478)



Abbildung 10: Diagramm Fadenpilze vs. Sprosspilze aller positiven Pilzbefunde (2006-2010)

Fadenpilze in Prozent
(n = 233)

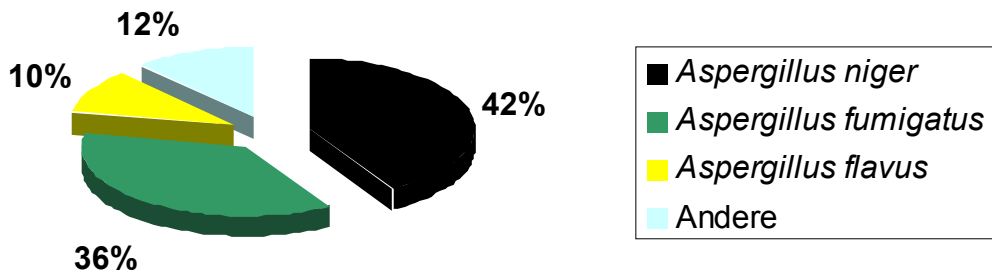


Abbildung 11: Diagramm Fadenpilze aller positiven Pilzbefunde (2006-2010)

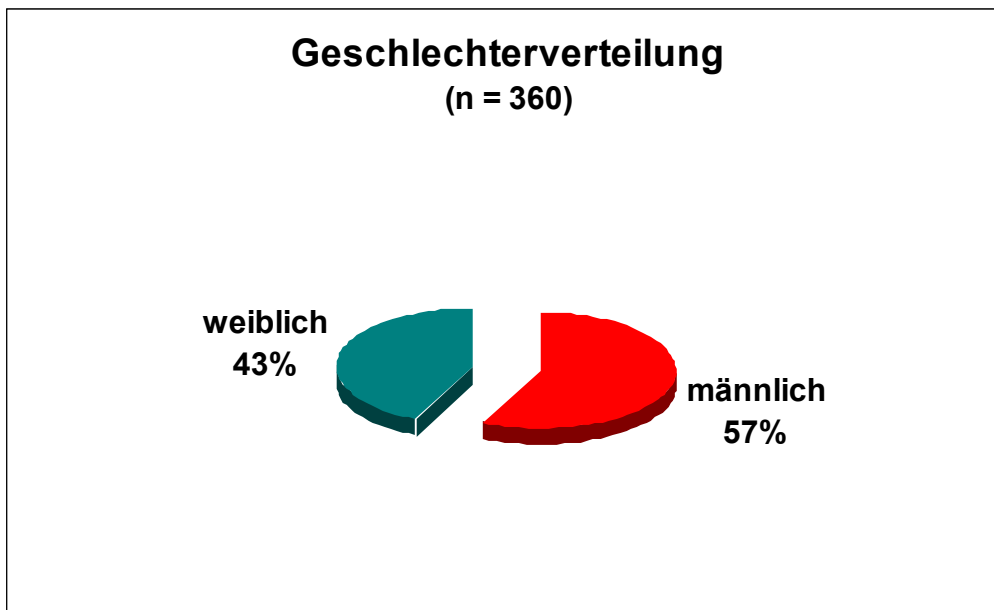


Abbildung 12: Geschlechterverteilung der Patienten aller positiven Pilzbefunde (2006-2010)

Männliche Patienten waren mit Pilzbefunden im Ohr häufiger konfrontiert. Die Ergebnisse sind allerdings nicht auf diagnostizierte Otomykosen zurückzuführen und bieten nur einen Gesamtüberblick der im Ohr gefundenen Pilze der letzten fünf Jahre.

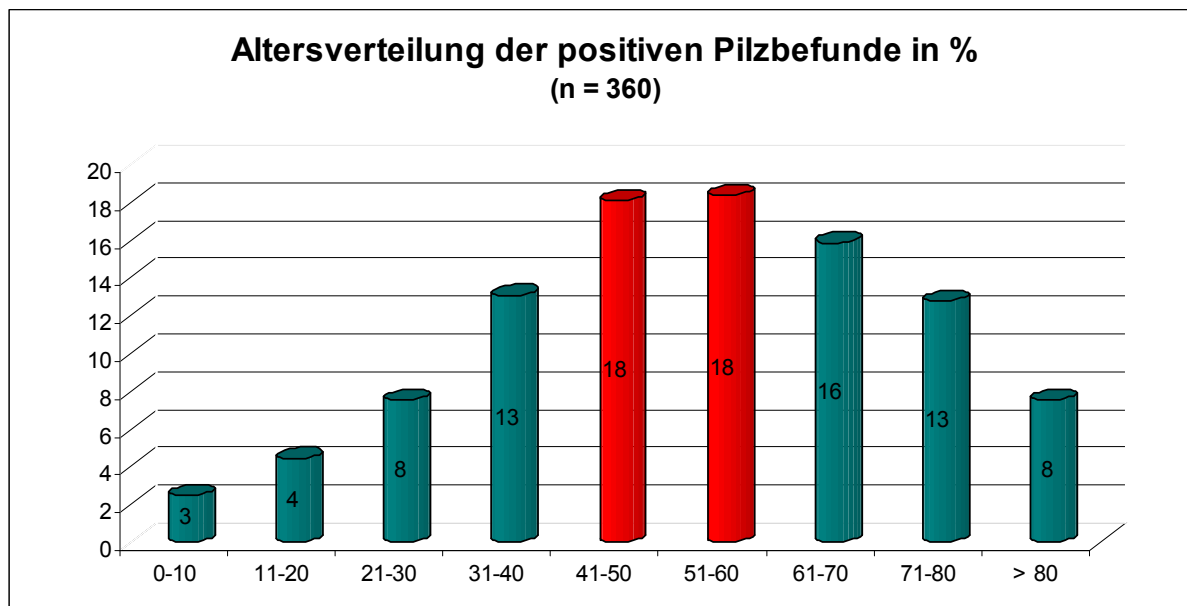


Abbildung 13: Altersverteilung der Patienten aller positiven Pilzbefunde (2006-2010)

Der Altersschnitt betrug 52,3 Jahre mit einem Medianwert von 52 und einer Standardabweichung von 19,88 Jahren. Am häufigsten mit positiven Pilzbefunden konfrontiert waren die Altersgruppen der 41- bis 50-Jährigen und 51- bis 60-Jährigen (je 18%).

4. Diskussion

4.1 Biologische Diskussion

Morphologisch

Morphologisch konnten keine Unterschiede zwischen den schwarzen Aspergillen entdecken. Auch in der bis vor einigen Monaten vorhandenen Literatur konnten keine eindeutigen phenotypischen Unterscheidungsmerkmale gefunden werden.^{44-50,52-54,56}

In der erst kürzlich erschienenen Arbeit von Daiani et al.⁵¹ wurden die Pilze der Artengruppe der *Aspergillus section nigri*, entnommen von Lebensmitteln, Getreidekörnern und Höhlen, unter dem Begriff „polyphasic taxonomy“, also anhand verschiedener morphologischer, physiologischer sowie molekularbiologischer Methoden differenziert.

Obwohl sie, wie der Rest der Fachwelt der Meinung sind, dass die drei Arten *A. tubingensis*, *A. foetidus* und *A. niger* morphologisch ähnlich und dadurch schwierig zu unterscheiden sind und wenn überhaupt die Unterschiede nur feinsinnig seien, sind sie davon überzeugt, morphologische Differenzierungsmerkmale zwischen *A. tubingensis*, *A. foetidus* und *A. niger* gefunden zu haben. *A. tubingensis* unterschied sich makroskopisch bei seiner Produktion von Sklerotien, welche farblich vom Weißen ins Pinke übergehen, wie schon Varga et al. 2007⁵⁵ angemerkt hat. Samson et al. 2004 konnten diese Sklerotienproduktion bei *Aspergillus tubingensis* nicht immer beobachten.⁵³ Zusätzlich berichten sie von einem elektronenmikroskopisch nachweisbaren Differenzierungsmerkmal, wobei sich *A. foetidus* anhand der Gestalt seiner Konidien (conidial ornamentation) von den beiden anderen Aspergillen unterscheidet.⁵¹

Molekularbiologische Identifikation

Trotz der Schwierigkeiten *A. niger*, *A. tubingensis* und *A. foetidus* morphologisch zu differenzieren, können diese Arten anhand ihrer DNA-Sequenzen von dem Cytochrome b Gen⁵², der ITS-Region⁴⁵ und des β -Tubulin Gens^{53,57} und durch RFLP und andere Fingerprinting Methoden⁴⁷ unterschieden werden.

Das ITS Daten Set kann verwendet werden, um zwischen vier Gruppen der *Aspergillus section nigri* zu unterscheiden: 1. *A. niger* und *A. lacticoffeatus* Isolate; 2. *A. bra-*

siliensis; 3. *A. costaricaensis*; 4. *A. tubingensis*, *A. foetidus*, *A. vadensis* und *A. piperris*.⁵⁵

Heutzutage ist die Identifikation mittels Sequenz-basierender Methoden weit verbreitet. In der *Aspergillus section Nigri* Gruppe können alle Arten (species) voneinander mit Gebrauch der Calmodulin Sequenz Daten unterschieden werden.

Bis auf wenige Ausnahmen^{51,56} (*A. costaricaensis* und *A.sp UFLA*, *A. lacticoffeatus*) eignen sich hervorragend die β -tubulin Sequenzen.⁵⁶

In unserer Sequenzanalyse der ITS1 5,8S rDNA-ITS2 Region trennten die Sequenzen von *A. niger* und *A. tubingensis* bzw. *A. foetidus* drei Nukleotide. Dieselben Beobachtungen machten Parenicova et al. 2000 und González-Salgado et al. 2005.^{45,49} Accensi et al. fanden sieben Basenunterschiede.⁵⁸

Im Gegensatz zu Parenicova et al. 2000⁴⁵ konnten in unseren Proben zwischen *A. tubingensis* und *A. foetidus* keine Basenveränderungen nachgewiesen werden. Allerdings waren diese auch nur in geringer Anzahl vorhanden.

Vielversprechender erwies sich, wie auch bereits in anderen Studien^{53,56,57} berichtet wurde, das β -Tubulin Gen. *A. foetidus* und *A. tubingensis* konnten wir durch 10 Nukleotidveränderungen voneinander trennen und auch die Sequenzen von den mitgelaufenen *A. niger* Strängen unterschieden sich mit 34 Basenveränderungen von *A. foetidus* sowie mit 31 unterschiedlichen Nukleotiden von *A. tubingensis* viel deutlicher als mit den Primern der ITS-Region. Zusätzlich sei noch erwähnt, dass sich die *A. foetidus* Sequenz in sieben Nukleotiden von den beiden anderen abgrenzen ließ.

4.2 Klinische Diskussion

Bei 15 Patienten der HNO-Klinik Graz wurde zusätzlich, neben der exakten molekularbiologischen Identifizierung, der Pilzbefund retrospektiv klinischen Befunden gegenübergestellt. Die Daten entstammen vom klinischen Kommunikations- und Informationsnetzwerk MEDOCS.

Symptome und ohrmikroskopischer Befund

Unter den 15 Patienten, deren klinische Befunde miteinbezogen worden waren, fand sich als häufigstes Symptom Otalgie (75%). Otorrhoe (44%) wurde am zweithäufigsten angegeben, gefolgt von beeinträchtigtem Gehör (31%).

Juckreiz war in unseren Aufzeichnungen nur in vier Fällen (25%) angegeben worden. Weitere Symptome waren das Gefühl, als wäre ein Fremdkörper im Ohr (19%), Tragusdruckschmerz (13%), sowie druckschmerzhaftige Lymphknoten (6%).

Am ehesten finden sich Parallelen in einer amerikanischen Arbeit⁵⁹, welche auch Otalgie und Otorrhoe (48%) als häufigste Beschwerden angibt, gefolgt von beeinträchtigtem Gehör (45%), Völlegefühl (33%) und Pruritus (23%). Zusätzlich erwähnten die Autoren noch Tinnitus (4%), welcher auch von Fasunla et al. (78%), Anjea et al. (27%) und Kaur et al. angegeben wird.^{23,29,30}

Die genannten Symptome stimmen im Großen und Ganzen mit anderen Beobachtungen^{23,25,26,29-31} (Otalgia 45% - 83,3%; Otorrhoe 30% - 67,3%, Völlegefühl 29,2% - 93%) überein, allerdings wird von der Mehrheit der Fachliteratur als Leitsymptom und auch als häufigstes Beschwerdebild Pruritus (60% - 97%) beschrieben.^{24-26,29-31}

Eine Otomykose ist anhand der Symptome kaum von einer bakteriellen Otitis externa zu unterscheiden.^{29,62} Zumeist ist eine Primärerkrankung im Ohr vorhanden,^{3,19,21,25,60} wie auch bei unseren Patienten, welche eine Pilzbesiedelung direkt oder indirekt fördert und eventuell ähnliche Beschwerden wie Otalgie, Otorrhoe und Hörverminderung verursachen kann.²⁵ Am spezifischsten für eine Otomykose scheint noch das Völlegefühl zu sein. Kaur et al. bezeichneten „Ear blockage“ als häufigstes (mit 93%) Symptom.²³

In der Ohrmikroskopie fanden sich folgende Beschreibungen, die auch in der Literatur angeführt werden.^{17,23-28,59}

Eine gerötete Gehörgangshinterwand, Beläge im Gehörgang sowie um das Trommelfell, weißer Pilzrasen, oberflächlich entzündliche Defekte am Trommelfell, weißlich gelbes Sekret, dunkles Sekret und Cerumen, nach Entfernung eines weißlich gelblichen Pfropfes zeigte sich ein vulnerabel entzündeter Gehörgang, massiv trübes Sekret mit Pilzhyphen, leicht gerötete Membran, geschwollener Gehörgang, Detritus auf Membran, im Gehörgang sowie im Gehörgangseingangsbereich aufgelockerter Gehörgang, weißlich gelbe Massen, schmierig geschwärzter Belag, watteartiger Fremdkörper mit schwärzlicher Auflagerung, weißlich bräunliches Sekret mit Pilzhyphen, hinter Pilzbelag infizierte nekrotische Gehörgangshaut, nach Reinigung Sickerblutung, Pilzrasen am Trommelfell, enger Gehörgang, Membran schmierig belegt, nach Entfernung von Detritus auch blander Gehörgang und blandes Trommelfell.

In drei Fällen zeigte sich auch eine Trommelfellperforation, wobei jedoch nicht nachzuvollziehen war, inwieweit der Schimmelpilz daran beteiligt war. Von Seiten der befindenden Ärzte zeigte sich in unseren 15 Fällen nie ein Befall der Mittelohrschleimhaut.

Prädisponierende Faktoren

In den 15 retrospektiv betrachteten Fällen stand zu 67% (10/15) immer eine andere Diagnose vor dem Auftreten eines Pilzrasens bzw. der Diagnose einer Otomykose. Primäre Ohrerkrankungen, wie eine Otitis media oder bakteriell bedingte Otitis externa, scheinen in unseren Fällen als direkter oder indirekter (nach Anbehandlung mit Antibiotika) Auslöser von Otomykosen eine große Rolle zu spielen. Viele Autoren teilen ebenfalls diese Ansicht.^{2,3,7,21,22,24,25,27,28}

Vennewald et al. 2002 fanden eine Otomykose zum größten Teil in Patienten mit chronischer Otitis media mit oder ohne Cholesteatom. Sie sind der Meinung, dass der permanente Ohrausfluss zu einer Mazeration des Gehörgangsepithels führt und eventuell ein Pilzwachstum in Patienten mit Otitis media fördern könnte. Der Fund von Conidophoren im äußeren Gehörgang vermittelte die Hypothese, dass die Pilze den Schleim als Nährmedium benutzen können.³

Es war aber auch möglich, ein Auftreten einer Otomykose ohne eine Primärerkrankung oder Prädisposition in der Krankengeschichte zu entdecken. Eine Otomykose kann alleine in Verbindung mit einer bakteriellen Infektion existieren oder sekundär zu einer entstehen.^{20,26,27,28}

Mitunter wird der Gebrauch von Antibiotika und Steroiden von vielen Autoren verantwortlich für ein Auftreten von Otomykosen gemacht.^{3,19,22-24,7-31,60} Auch bei uns ging in einer Vielzahl (8/15; 53%) der Fälle eine lokale sowie orale antibiotische Behandlung dem Pilzbefund voraus. In einigen Fällen wurde auch ein topisches Corticosteroid angewendet.

Einmal zeigte sich eine Kolonisation von *Aspergillus niger* bei einem Patienten mit Cerumenobturation. Schon oft wurde in der Vergangenheit Pilzwachstum auf Cerumen beschrieben^{1,19,23} und seine Rolle vielfach diskutiert. Fungistatisch soll das Cerumen nur auf Trichophytonarten und nur in geringem Maß gegen Aspergillen wirken.⁷ Andere sprechen von einer Förderung des Wachstums von Aspergillen durch Cerumen, während andere Pilzarten ihr Wachstum durch dessen Anwesenheit nicht beeinträchtigen ließen.^{17,23} Einige Autoren geben allerdings ein fehlendes Vorhandensein von Cerumen als auslösenden Faktor für eine Otomykose an.^{28,31,2}

Einmal entwickelte sich bei einer Patientin nach Attikoantrotomie eine Pilzbesiedelung in einer chronisch feuchten Radikalhöhle. Kurnatowski und Nielsen beobachteten ein vermehrtes Auftreten in solchen Fällen.^{25,60}

Weitere prädisponierende Faktoren laut Literatur^{3,17,22-31} wie Immunsuppression, Trauma durch Kratzen mit Fingernägeln, eine Pilzinfektion an einer anderen Stelle des Körpers, eine Gaumenspalten-OP in der Anamnese und ein enger Gehörgang konnte in den Krankengeschichten je einmal aufgefunden werden.

Auf dem Boden eines Cholesteatoms trat ebenfalls ein Wachstum von *Aspergillus niger* auf, was auch anderen Beobachtungen entspricht.^{19,27}

Therapie

Therapie der Otomykose erfolgte, wie auch in der Literatur üblich, mit einer gründlichen Reinigung in Kombination mit antimykotischen Ohrentropfen.^{3,17,22,24-29,59} In

zehn von 15 Fällen (67%) wurde Clotrimazol angewendet. In zwei Fällen (13%) wurden Econazol Produkte verwendet.

Einmal wurde nur eine Desinfektion mit H₂O₂ durchgeführt. Zweimal führte eine mechanische Reinigung mit der Beseitigung des Grundleidens zu einer Besserung. Wenn sich nach der Entfernung eine reizlose Gehörgangshaut zeigt und der Patient weder Juckreiz oder Schmerzen angibt, so ist nach der minutiösen Reinigung keine weitere spezifische Therapie erforderlich.²⁴

Eine breite Palette an antimykotischen Ohrentropfen steht zur Verfügung, wobei die Frage nach der Ototoxizität dieser Ohrentropfen in der Literatur wiederholt diskutiert wurde. Wie Vennewald et al. 2010 jedoch bestätigten, sind, neben dem bei uns verwendeten Clotrimazol, auch Miconazol, Bifonazol, Ciclopiroxolamin und Tolfanat eine potente, aber auch zugleich sichere Wahl für eine Behandlung einer Otomykose, auch für Patienten mit einem perforierten Trommelfell.^{2,24}

Für den Fall einer invasiven Form einer Otomykose, oft verkompliziert durch Mastoiditis oder Meningitis, stehen orale Triazole (Itraconazol, Voriconazol und Posaconazol) zur Verfügung. Diese Medikamente wirken gegen *Aspergillus* und *Candida* Spezies und haben eine gute Penetration von Knochen und dem zentralen Nervensystem. In der Schweiz verabreichte man erfolgreich intravenös Amphotericin B gefolgt von einer längeren oralen Therapie mit Itraconazol bei einer durch *Aspergillus niger* ausgelösten Infektion bei einem Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2.³⁶

Demographie

Aspergillus species und *Candida species* sind die häufigsten Verursacher einer Otomykose.^{17,24} Ihr Auftreten variiert mit den klimatischen Bedingungen. In gemäßigten Klimazonen werden vermehrt *Candida species*^{25,60} und in tropischen, subtropischen Gebieten vermehrt Aspergillen isoliert.^{23,26,30}

Die *Candida sp.* ist in unseren Breitengraden am häufigsten im Gehörgang zu finden. Sie lösen hier auch häufiger Otomykosen aus, wie uns amerikanische und europäische Arbeiten demonstrieren.^{3,25,27,60}

Weltweit gesehen wird *Aspergillus niger* am häufigsten in Otomykose-Fällen publiziert.²⁸ Vor allem in Indien^{20,23,30} und Nigeria,^{29,61} wo die Krankheit häufiger diagnostiziert und behandelt wird.

Nicht zu unterschätzen ist auch die Präsenz von *Aspergillus niger sensu lato* in unseren Klimaten.^{3,24,25} Von den letzten fünf Jahren wurden die positiven Pilzbefunde im äußeren Gehörgang im Großraum Graz überprüft und sie zeigen, nach *Candida parapsilosis* (29%) mit 197 Isolaten (20%), das zweithäufigste Vorkommen. *Aspergillus niger sensu lato* ist im Großraum Graz der am häufigsten isolierte Fadenpilz.

Bis dato ist noch keine Arbeit über Otomykosen auf eine molekularbiologische Differenzierung der als *Aspergillus niger* identifizierten schwarzen Kulturen eingegangen. Unsere Arbeit zeigt nach einer Differenzierung der *Aspergillus section nigri* durch Primer der ITS-Region und des β -Tubulin Gens ein Auftreten von *Aspergillus niger* zu nur 54%, den Rest der schwarzen Aspergillen machen *Aspergillus tubingensis* und *Aspergillus foetidus* aus. Ob diese Differenzierung auch Auswirkung auf die Therapie oder den Verlauf der Otomykose hat, müssen erst weitere Untersuchungen zeigen.

5. Zusammenfassung

Unter Otomykosen versteht man im Allgemeinen pilzbedingte superfizelle Infektionen des äußeren Ohres, äußeren Gehörgangs, Trommelfells, Mittelohrs und gegebenenfalls postoperativer Höhlen. Otomykosen sind seit der Mitte des 19. Jahrhunderts bekannt.

Aspergillus niger ist ein Umweltkeim, dessen Sporen ubiquitäre Bestandteile der Außenluft sind. Verwendung findet dieser Schimmelpilz vor allem in der Lebensmittelindustrie, wo er schon seit vielen Dekaden in der Produktion von extrazellulären Enzymen (Lebensmittel) und Zitronensäure eingesetzt wird.⁵⁰ Dieses „Engagement“ macht ihn vor allem für die Molekularbiologie interessant und Molekularbiologen entdecken immer mehr unterschiedliche Arten in schwarzen Kulturen, welche alle zur *Aspergillus section nigri* (*Aspergillus niger sensu lato*) zählen.

Aspergillus niger sensu lato ist nicht nur der am häufigsten isolierte Schimmelpilz, weltweit gesehen ist er sogar der am öftesten isolierte Pilz in Otomykosen. Selten aber wird bis zum Species Level differenziert.

Im Zeitraum von Juni/09 bis Dezember/10 wurden insgesamt 46 unterschiedliche Proben an im Gehörgang entdeckten oberflächlich schwarzen Aspergillen sowohl von der Universitätsklinik für HNO in Graz als auch von der Universitätsklinik Innsbruck gesammelt. Diese Stämme wurden morphologisch und mittels molekularbiologischer Methoden (ITS-Region, β -Tubulin Gen) untersucht, um sie mittels Referenzstämmen eindeutig zu differenzieren. Identifiziert werden konnten *Aspergillus niger* (54%), *Aspergillus tubingensis* (37%) und *Aspergillus foetidus* (9%).

Weiters wurde der klinische Hintergrund von Patienten aus dem Probengut, von denen Daten zur Verfügung standen, untersucht, um ein besseres Verständnis für die Verhältnisse, die für das Entstehen dieser Art der Mykose verantwortlich sind, zu bekommen. Bei vielen dieser Patienten waren bereits diagnostizierte Primärerkrankungen (bakteriell bedingte Otitis externa, Otitis media, Cholesteatom, Cerumenobturation) und dadurch sehr oft antibiotische und/oder steroidale Behandlungen gegeben. Patienten präsentierten sich aber auch beim Erstbesuch mit einer Otomykose ohne den Nachweis einer Primärerkrankung, einer Prädisposition und eines positiven bakteriologischen Befundes. Symptome waren, bis auf ein Völlegefühl, eher unspezifisch im Vergleich zu einer bakteriellen Otitis externa. Mischinfektionen mit Bakterien so-

wie mit einem Hefepilz waren genauso präsent wie ein alleiniges Vorhandensein von *Aspergillus niger*.

Abschließend wurden die Pilzbefunde (aus dem Ohr) der letzten fünf Jahre im Großraum Graz überprüft. Aus 425 positiven Pilzbefunden und 360 Patienten fanden wir eine knappe Mehrheit auf Seiten der Hefepilze (51%) gegenüber den Fadenpilzen (49%).

Das vorherrschende Isolat unter den 28 verschiedenen Arten war *Candida parapsilosis* (29%), am zweithäufigsten und somit der häufigste Schimmelpilz war *Aspergillus niger sensu lato* (20%).

Der Altersschnitt betrug 52,3 Jahre (Medianwert: 52) mit einer Standardabweichung von 19,88 Jahren. Am häufigsten mit positiven Pilzbefunden konfrontiert waren die Altersgruppen der 41- bis 50-Jährigen und 51- bis 60-Jährigen (jeweils 18%). Männer (57%) waren häufiger mit einem positivem Pilzbefund konfrontiert als Frauen (43%).

6. Abstract

Aspergillus niger in otomycosis

Otomycosis is a superficial mycotic infection of the external ear, external auditory canal, middle ear and postoperative cavities, and known since the mid nineteenth century. Among other *Aspergillus* species, *Aspergillus niger* is the most prevalent in this entity. Other fungi, as *Scedosporium* sp. and yeasts are seen with variable frequency.

Aspergillus niger is ubiquitous and is one of the most important microorganisms used in biotechnology to produce extracellular enzymes (food) and citric acid. Molecular methods revealed recently, that *Aspergillus sensu lato* rather comprises a species group called the *Aspergillus section nigri*.

Aspergillus niger sensu lato is the major causal agent in otomycosis reported globally, but to our knowledge there are no reports where identification of otomycosis-related isolates to the species level was performed.

We have collected all *Aspergillus* species of the auditory canal in the University ENT Hospitals of Innsbruck and Graz for two years. 46 of these isolates belonged to *Aspergillus niger sensu lato*. These strains were investigated morphologically and with molecular methods in order to identify them on the species level. In summary we have identified the three closely related species *Aspergillus niger sensu stricto* (54%), *Aspergillus tubingensis* (37%) und *Aspergillus foetidus* (9%).

Furthermore the clinical background of the patients was investigated to gain a better understanding of the underlying conditions for these mycoses. In many cases a primary disease was observed and therefore the patients often received a prior treatment with antibiotics and/or topical steroids. Patients also presented with otomycosis without any other diseases or prior antimicrobial treatment. Mixed infections with bacteria and yeasts were also discovered.

Finally all positive fungal cultures of the ears over the last five years were investigated. In 425 positive fungal cultures yeasts represented 51%, moulds 49%. *Candida parapsilosis* (29%) was more common than *Aspergillus niger sensu lato* (20%), representing the dominating mould.

The average age of this patient group was 52,3 years (median: 52) and positive fungal cultures were most common in the age groups of the 41-50 and 51-60 age (18% each). Males (57%) were more frequently affected than females (43%).

7. Literatur

1. Siebenmann F. (1883). Die Fadenpilze. Wiesbaden: J. F. Bergmann.
2. Vennewald I, Klemm E. Otomycosis: Diagnosis and treatment. Clinics in Dermatology 2010; 28: 202-211.
3. Vennewald I, Schönlebe J, Klemm E. Mycological and histological investigations in humans with middle ear infections. Mycoses 2003; 46: 12-18.
4. Bhally HS, Shields C, Lin SY, Merz WG. Otitis caused by *Scedosporium apiospermum* in an immunocompetent child". Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2004; 68: 975-978.
5. Choo MJ, Yang SK, Jin HR, Lee OJ. Localized cryptococcal infection combined with cholesteatoma of the ear". Otolaryngol Head Neck Surg 2002; 126: 453-454.
6. Enweani IB, Iqumbor H. Prevalence of otomycosis in malnourished children in Edo State, Nigeria. Mycopathologia 1997-98; 140: 85-87.
7. Schönborn C, Holzegel K. Zur Pilzflora des gesunden äußeren Gehörganges. Dermatol Wochenschr 1967; 153: 760-770.
8. Watanabe S. Dermatophytosis of the external auditory meatus. J Med Vet Mycol 1986; 24: 485-486.
9. Derebery MJ, Berliner K. Foot and ear disease – the dermatophytid reaction in otology. Am Laryngol Rhinol Otol Soc Annu Meet Pap 1995; 106: 181-186.
10. Buzina W, Lang-Loidolt D, Ginter-Hanselmayer G. *Trichophyton rubrum* in the external auditory meatus. Mycoses 2004; 47: 85-86.
11. Ozcan M, Ozcan KM, Karaaslan A., et al. Concomitant otomycosis and dermatomycoses: a clinical and microbiological study. Eur Arch Otorhinolaryngol 2003; 260: 24-27.
12. Ohki M, Ito K, Ishimoto SI. Fungal mastoiditis in an immunocompetent adult. Eur Arch Otorhinolaryngol 2001; 258: 106-108.
13. Tiwari S, Singh SM, Jain S. (). Chronic bilateral suppurative otitis media caused by *Aspergillus terreus*. Mycoses 1995; 38: 297-300.
14. Cunningham M, Yu VL, Turner J, Curtin H. Necrotizing otitis externa due to *Aspergillus* in an immunocompetent patient. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1988; 114: 554-556.
15. Hoshino T, Matsumoto M. Otomycosis: subdermal growth in calcified mass. Eur Arch Otorhinolaryngol 2006; 263: 875-878.
16. Dhindsa MK, Maidu J, Singh SM, et al. Chronic suppurative otitis media caused by *Paecilomyces variotii*. J Med Vet Mycol 1995; 33: 59-61.
17. Stern JC, Lucente FE. Otomycosis". Ear Nose Throat J. 1988; 67: 804-805, 809-810.
18. Hawke M, Keene M, Alberti P. (1984). "Clinical Otoscopy". Edinburgh, London: Churchill Livingstone
19. Fendel K. Beitrag zum Problem der Otomykosen. HNO 1958; 6: 362-364 .

20. Sood VP, Sinha A, Mohapatra LN. Otomycosis: a clinical entity--clinical and experimental study. *J Laryngol Otol*. 1967; 81: 999-1004.
21. Talwar P, Chakrabarti A, Kaur P, Pahwa RK, Mittal A, Mehra YN. Fungal infections of ear with special reference to chronic suppurative otitis media. *Mycopathologia*. 1988; 104: 47-50.
22. Falser N. Mycotic infection of the ear: a harmless saprophyte or pathognomonic risk factor? *Laryngol Rhinol Otol (Stuttg)*. 1983; 62: 140-146.
23. Kaur R, Mittal N, Kakkar M, Aggarwal AK, Mathur MD. Otomycosis a clinicomycologic study. *Ear Nose Throat J*. 2000; 79: 606-609.
24. Dyckhoff G, Hoppe-Tichy T, Kappe R, Dietz A. Antimykotische Therapie bei Otomykose mit Trommelfelldefekt. *HNO* 2000; 48: 18-21.
25. Kurnatowski P, Filipiak A. Otomycosis: prevalence, clinical symptoms, therapeutic procedure. *Mycoses* 2001; 44: 472-479.
26. Pradhan B, Tuladhar NR, Amatya RM. Prevalence of otomycosis in outpatient department of otolaryngology in Tribhuvan University Teaching Hospital, Kathmandu, Nepal. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2003; 112: 384-387.
27. Martin TJ, Kerschner JE, Flanary VA. Fungal causes of otitis externa and tympanostomy tube otorrhea. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2005; 69: 1503-1508.
28. J. Araiza, P. Canseco and A. Bonifaz, Otomycosis: clinical and mycological study of 97 cases. *Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord)* 2006; 127: 251-254.
29. Fasunla J, Ibekwe T, Onakoya P. Otomycosis in western Nigeria. *Mycoses* 2008; 51: 67-70.
30. Aneja KR, Sharma C, Joshi R. Fungal infection of the ear: a common problem in the north eastern part of Haryana. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2010; 74: 604-607.
31. Pontes ZB, Silva AD, Lima Ede O, Guerra Mde H, Oliveira NM, Carvalho Mde F, Guerra FS. Otomycosis: a retrospective study. *Braz J Otorhinolaryngol* 2009; 75: 367-370.
32. Haruna S, Haruna Y, Schachern PA, et al. Histopathology update: otomycosis. *Am J Otolaryngol* 1994; 15: 74-78.
33. Chen D, Lalwani AK, House JW, Choo D. Aspergillus mastoiditis in acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Otol* 1999; 20: 561-567.
34. Strauss M, Fine E. Aspergillus otomastoiditis in acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Otol* 1991; 12: 49-53.
35. Muñoz A, Martínez-Chamorro E. Necrotizing external otitis caused by *Aspergillus fumigatus*: computed tomography and high resolution magnetic resonance imaging in an AIDS patient. *J Laryngol Otol* 1998; 112: 98-102.
36. Bellini C, Antonini P, Ermanni S, et al. Malignant otitis externa due to *Aspergillus niger*. *Scand J Infect Dis* 2003; 35: 284-288.
37. Phillips P, Bryce G, Shepherd J, Mintz D. Invasive external otitis caused by *Aspergillus*. *Rev Infect Dis* 1990; 12: 277-281.
38. Gordon G, Giddings NA. Invasive otitis externa due to *Aspergillus* species: case report and review. *Clin Infect Dis* 1994; 19: 866-870.

39. Menachof MR, Jackler RK. Otogenic skull base osteomyelitis caused by invasive fungal infection. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1990; 102: 285-289.
40. Fanghänel J, Pera F, Anderhuber F, Nitsch R (2003). "Waldeyer- Anatomie des Menschen". Berlin, New York: Walter de Gruyter
41. Hof H. (2003). "Mykologie für Mediziner". Stuttgart, New York: Thieme Verlag
42. Seebacher, C. et al. (1990). "Mykosen". Jena: Gustav Fischer Verlag
43. Müller, E. and W. Loeffler (1992). "Mykologie". Stuttgart, New York: Thieme Verlag
44. Varga J, Kevei F, Hamari Z, Tóth B, Téren J, Croft JH, Kozakiewicz Z. Genotypic and phenotypic variability among black aspergilli. In: Samson RA, Pitt JI (eds) Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Harwood, Amsterdam 2000; pp 397–411.
45. Parenicová L, Skouboe P, Samson RA, Rossen L, Visser J. Molecular tools for the classification of black aspergilli. In: Samson RA, Pitt JI (eds) Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Harwood, Amsterdam 2000; pp 413–424.
46. Kusters-van Someren MA, Samson RA, Visser J. The use of RFLP analysis in classification of the black *Aspergilli*: reinterpretation of the *Aspergillus niger* aggregate. *Curr Genet* 1991; 19: 21–26.
47. Abarca ML, Accensi F, Cano J, Cabañes FJ. Taxonomy and significance of black aspergilli. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2004; 86: 33-49.
48. Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. Species identification and antifungal susceptibility patterns of species belonging to *Aspergillus* section *Nigri*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 4514-4517.
49. González-Salgado A, Patiño B, Vázquez C, González-Jaén MT. Discrimination of *Aspergillus niger* and other *Aspergillus* species belonging to section *Nigri* by PCR assays. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 245: 353-361.
50. Schuster E, Dunn-Coleman N, Frisvad JC, Van Dijck PW. On the safety of *Aspergillus niger*--a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002; 59(4-5): 426-435.
51. Daiani M, Silva, Luís R, Batista, Elisângela F, Rezende, Maria Helena P, Fungaro, Daniele Sartori, Eduardo Alves. Identification of fungi of the genus *Aspergillus* section *nigri* using polyphasic taxonomy. *Braz J Microbiol* 2011; 42: 761-773.
52. Yokoyama K, Wang L, Miyaji M, Nishimura K. Identification, classification and phylogeny of the *Aspergillus* section *Nigri* inferred from mitochondrial cytochrome b gene. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 200: 241-246.
53. Samson RA, Houbraken J, Kuijpers AFA, Frank JM, Frisvad JC. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Stud Mycol* 2004; 50: 45–61.
54. De Hoog GS, Guarro J. (2002). Atlas of clinical fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht and Universitat Rovira i Virgili Reus (Spain).
55. Varga J, Kocsabè S, Tóth B, Frisvad JC, Perrone G, Susca A, Meijer M, Samson RA. *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriolate black *Aspergillus* species with world-wide distribution. *Int J System Evol Microbiol* 2007; 57: 1925–1932.

56. R.A. Samson, P. Noonim, M. Meijer, J. Houbraken, J.C. Frisvad and J. Varga. Diagnostic tools to identify black aspergilli. *Stud Mycol* 2007; 59(1): 129-145.
57. Vries RP de, Frisvad JC, Van de Vondervoort PJI, Burgers K, Kuijpers AFA, Samson RA, Visser J. *Aspergillus vadensis*, a new species of the group of black As-pergilli. *Antonie van Leeuwenhoek* 2005; 87: 195–203.
58. Accensi F, Cano J, Figuera L, Abarca ML, Cabanes FJ. New PCR method to differentiate species in *Aspergillus niger* aggregate. *FEMS Microbiol Lett* 1999; 180: 191- 196.
59. Ho T, Vrabec JT, Yoo D, Coker NJ. Otomycosis: clinical features and treatment implications. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2006; 135: 787-791.
60. Nielsen PG. Fungi isolated from chronic external ear disorders. *Mykosen* 1985; 28: 234-237.
61. Mgbor N, Gugnani HC. Otomycosis in Nigeria: treatment with mercurochrome. *Mycoses* 2001; 44: 395- 397.
62. Arnold W, Ganzer U. (2004). „Checkliste Hals-Nasen-Ohrenheilkunde“. Stuttgart, New York: Thieme Verlag

Anhang



Medizinische Universität Graz

Ethikkommission
Auenbruggerplatz 2, A-8036 Graz
ethikkommission@medunigraz.at
Tel.: +43 / 316 / 385-13928
Fax: +43 / 316 / 385-14348

VOTUM gültig bis 25.06.2011

EK-Nummer: 21-187 ex 09/10
Studientitel: Pilotstudie Otomykosen - Prävalenz und Erreger
Prüfer: *) Prof. Ing. Mag. Dr. Walter Buzina
Inst. für Hygiene
Sponsor: (Prüfer)
CRO: -

*) Antragsteller

Die o.a. Studie wurde von der Ethikkommission erstmals im 'expedited Review' am 21.01.2010 behandelt. Die Ethikkommission ist zu folgendem Schluss gekommen:

Es besteht kein Einwand gegen die Durchführung der Studie in der vorliegenden Form.

Kommissionsmitglieder, die für diesen Tagesordnungspunkt als befangen anzusehen waren und daher gemäß Geschäftsordnung an der Entscheidungsfindung und Abstimmung nicht teilgenommen haben:
keine

Zur Beurteilung vorliegende Dokumente:

Dokumente eingegangen am 19.01.2010, begutachtet im 'expedited Review' am 21.01.2010

✓ Antragsformular	15.01.2010
✓ Informed Consent Form	15.01.2010

Dokumente eingegangen am 25.02.2010 (in der nächsten Begutachtung mitbegutachtet)

Originalprotokoll (undatiert)

Dokumente eingegangen am 24.06.2010, begutachtet im 'expedited Review' am 25.06.2010

✓ Originalprotokoll 1.0	15.01.2010
-------------------------	------------

Die Ethikkommission geht – rechtlich unverbindlich – davon aus, dass es sich weder um eine klinische Prüfung nach AMG noch nach MPG handelt.

Es handelt sich um eine Studie im Rahmen einer Diplomarbeit.

Das Votum der Ethikkommission berührt in keiner Weise die alleinige Verantwortung der Prüferin / des Prüfers / der Prüfer für die ordnungsgemäße Durchführung der Studie unter Einhaltung aller einschlägiger gesetzlicher Bestimmungen und Richtlinien.

Weiters machen wir darauf aufmerksam, dass der Kommission unverzüglich zu melden sind:

- Abweichungen vom Protokoll aus Sicherheitsgründen oder Protokolländerungen
- Änderungen, die das Risiko der Teilnehmer/-innen erhöhen oder die Durchführung der Studie wesentlich beeinflussen
- Mutmaßliche unerwartete schwerwiegende Nebenwirkungen - SUSARs (AMG-Studien ab 1.5.2004) oder schwerwiegende unerwünschte Ereignisse - SAEs (andere Studien)

EK-Nummer: 21-187 ex 09/10

Votum

Seite 1 von 2


Medizinische Universität Graz, Universitätsplatz 3, A-8010 Graz. www.medunigraz.at


Rechtsform: Juristische Person öffentlichen Rechts gem. Universitätsgesetz 2002. Information: Mitteilungsblatt der Universität und www.medunigraz.at. DVR-Nr. 210 9494.
UID: ATU 575 111 79. Bankverbindung: Bank Austria Creditanstalt BLZ 12000 Konto-Nr. 500 948 400 04, Raiffeisen Landesbank Steiermark BLZ 38000 Konto-Nr. 49510.

- Jegliche Information über sonstige Umstände, die die Sicherheit der Teilnehmer/-innen oder die Durchführung der Studie beeinträchtigen können

Dieses Votum gilt für ein Jahr ab dem Datum der Ausstellung. Bei längerer Studiendauer ist rechtzeitig vor Ablauf der Gültigkeit des Votums ein Zwischenbericht vorzulegen (Berichtsformular), um eine etwaige Verlängerung zu erlangen.

Graz, 25. Juni 2010


Univ.Prof.DI/Dr.Peter H. Rehak
Vorsitzender


Univ.Prof.DDr.Hans-Peter Kapfhammer
Stv. Vorsitzender

Achtung: Bitte bei allen das Projekt betreffende Schreiben oder telefonischen Anfragen die EK-Nummer angeben!

EK-Nummer: 21-187 ex 09/10

Votum

Seite 2 von 2

Medizinische Universität Graz, Universitätsplatz 3, A-8010 Graz. www.medunigraz.at

Rechtsform: Juristische Person öffentlichen Rechts gem. Universitätsgesetz 2002. Information: Mitteilungsblatt der Universität und www.medunigraz.at. DVR-Nr. 210 9494.
UID: ATU 575 111 79. Bankverbindung: Bank Austria Creditanstalt BLZ 12000 Konto-Nr. 500 948 400 04, Raiffeisen Landesbank Steiermark BLZ 38000 Konto-Nr. 49510.

Otomykosen - Prävalenz und Erreger

Information und Einwilligungserklärung für Studienteilnehmerinnen und Studienteilnehmer (Version 1.0 vom 15.01.2010)

Sehr geehrte Patientin!
Sehr geehrter Patient!

1. Einleitung und Studienziel

Sie sind aufgrund Ihrer Erkrankung zur Therapie an unsere Klinik gekommen. Wir werden Sie bestmöglich unterstützen und hoffen, dass Sie sich hier wohl fühlen. Neben der optimalen Unterstützung sind wir auch bemüht, neue wissenschaftliche Erkenntnisse zu gewinnen, um in Zukunft noch besser helfen zu können. Zu diesem Zweck wurde an unserer Abteilung eine Studie gestartet, die sich mit dem Befall des Gehörganges mit Pilzen beschäftigt. Wir sind vor allem daran interessiert festzustellen, um welche Pilze es sich handelt und ob bestimmte Grunderkrankungen oder Medikamente eine Pilzbesiedelung des Gehörganges beeinflussen.

2. Was bedeutet die Teilnahme an der Studie für Sie?

Wir würden uns sehr freuen, Sie als Teilnehmerin/Teilnehmer an der Studie gewinnen zu können. Die Teilnahme an der Studie bedeutet für Sie folgendes:

- Befragung durch die behandelnde Ärztin/den behandelnden Arzt
- Durchführung eines schmerzfreien Ohrenabstriches

Natürlich werden Sie über alle Untersuchungsergebnisse genau informiert und über deren Bedeutung aufgeklärt.

3. Freiwilligkeit der Teilnahme und Abbruchmöglichkeiten

Die Teilnahme an der Studie ist natürlich freiwillig. Bei Nichtteilnahme entstehen Ihnen keinerlei Nachteile. Sie können die Teilnahme an der Studie jederzeit ohne Angabe von Gründen beenden.

Eine Teilnahme an der Studie ändert nichts an Ihrer Behandlung. Die zusätzlichen, nicht-invasiven und schmerzlosen Untersuchungen dienen nur dem wissenschaftlichen Wissensgewinn und Ihrer Information.

Selbstverständlich entstehen Ihnen durch eine Teilnahme an der Studie auch keine Kosten für die darin enthaltenen Untersuchungen.

4. Anonymität

Die erhobenen Daten unterliegen der ärztlichen Schweigepflicht und werden vom Studienleiter bzw. Studienmitarbeiter anonymisiert. Das bedeutet, dass niemand außerhalb des Projektteams zurückverfolgen kann, von welchem Studienteilnehmer welche Daten stammen. Die gesammelten, anonymisierten Daten werden elektronisch verarbeitet und statistisch ausgewertet.

5. Rückfragen

Falls Sie noch Fragen zur Studie und zu den Untersuchungen haben, wenden Sie sich bitte direkt an den Studienleiter bzw. den Studienmitarbeiter oder ihren behandelten Arzt/ ihre behandelnde Ärztin.

6. Einwilligungserklärung zur Teilnahme an der Studie

Name der Patientin/des Patienten:.....

Geburtsdatum:.....

Telefon/Email:.....

Name der/des aufklärenden Studienverantwortlichen:

.....

Ich bin von oben genannter/m Studienverantwortlichen eingehend über die Studie informiert worden. Der Ablauf und Zweck wurde mir verständlich erläutert. Ich wurde über Freiwilligkeit der Teilnahme und über die Möglichkeit die Studie jederzeit abzubrechen aufgeklärt. Ich wurde über alle Fragen eingehend informiert, und die Telefonnummern für später auftretende Fragen sind mir bekannt.

Eine Kopie der Patienteninformation und Einwilligung habe ich erhalten, gelesen und verstanden.

Ich wurde über Art und Weise der Datenverarbeitung und über die Datenschutzmaßnahmen informiert.

Hiermit erkläre ich, dass ich alle mir erteilten Informationen verstanden habe, ich zur Teilnahme an der Studie bereit bin und mit der anonymen Verarbeitung meiner Daten einverstanden bin.

Ort, Datum

Unterschrift Studienteilnehmer/in

Ort, Datum

Unterschrift Studienverantwortliche/r