bielefeldfertilitycenter
Ihr Kinderwunschteam

KINDERWUNSCH DORTMUND SIEGEN DORSTEN WUPPERTAL
STANDORT DORSTEN UND
PRÄNATALMEDIZIN DORSTEN

NIPT –
Was ist möglich? Was ist nötig?

Dr. med. **Thomas von Ostrowski**

Thomas von Ostrowski

- 1893 : Georg Schmorl (dt. Pathologe *1861;gest. 1932): Trophoblasten in der Lunge von Patientinnen, die an einer Eklampsie verstorben waren
- 1997 : Lo et al. :cff DNA in maternal circulation
- 2011 : Detection trisomy 21/18/13
- 2015 : > 1.000.000 NIPT tests worldwide

Images from the History of Medicine (IHM)

NIPT: Dieses Verfahren gehört zu den Methoden zur Feststellung **genetischer Eigenschaften** und fällt in Bereich §3 Abs 1a GenDG.

- **Qualifikation zur fachgebundenen genetischen Beratung gemäß § 7 Abs. 3 und § 23 Abs. 2 GenDG (GROßER SCHEIN)**

Gesetz über genetische Untersuchungen bei Menschen (Gendiagnostikgesetz - GenDG)
§ 15 Vorgeburtliche genetische Untersuchungen
(3) Vor einer vorgeburtlichen genetischen Untersuchung und nach Vorliegen des Untersuchungsergebnisses ist die **Schwangere entsprechend § 10 Abs. 2 und 3 genetisch zu beraten** und ergänzend auf den Beratungsanspruch nach § 2 des Schwangerschaftskonfliktgesetzes hinzuweisen; der **Inhalt der Beratung ist zu dokumentieren.**

CAVE !!! Reicht nicht aus!

- **Qualifikation zur fachgebundenen genetischen Beratung im Kontext der vorgeburtlichen Risikoabklärung (prädiktiv) gemäß § 7 Abs. 1 und 3 sowie § 23 Abs. 2 GenDG (KLEINER SCHEIN)**

Gesetz über genetische Untersuchungen bei Menschen (Gendiagnostikgesetz - GenDG)
§ 25 Strafvorschriften
(1) Mit Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder mit Geldstrafe wird bestraft, wer …

bielefeldfertilitycenter
Ihr Kinderwunschteam

Thomas von Ostrowski
Gynäkologisches Symposium - Bielefeld 29.10.16
NIPT – Was ist möglich? Was ist nötig?

KINDERWUNSCH DORTMUND SIEGEN DORSTEN WUPPERTAL
STANDORT DORSTEN UND
PRÄNATALMEDIZIN DORSTEN

Deutscher Ethikrat

Die Mehrheit der Mitglieder des Ethikrates befürwortet die Anwendung des nicht-invasiven Bluttests ausschließlich bei Frauen mit Risikoschwangerschaften. Dabei soll eine weiterführende differenzierende Ultraschalluntersuchung sowie psychosoziale Beratung gewährleistet sein.

Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik (GfH)
zur Analyse fetaler DNA aus dem mütterlichen Blut

gfh

pränatalen Diagnostik gemindert werden kann. Möglicherweise könnte aber umgekehrt Druck auf jüngere schwangere Frauen zur Inanspruchnahme dieser Untersuchungsmöglichkeit ausgeübt werden. Da bei nicht invasiven vorgeburtlichen Untersuchungsmethoden die Abwägung von Eingriffsrisiken gegen die Wahrscheinlichkeit für eine Krankheit/gesundheitliche Störung des Kindes entfällt, hat dies zur Folge, dass die Untersuchung keiner Schwangeren vorenthalten werden kann, bzw. allen Schwangeren verfügbar gemacht werden sollte.

DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR GYNÄKOLOGIE UND GEBURTSHILFE e.V.

DGGG e.V. • Hausvogteiplatz 12 • 10117 Berlin

Gemeinsamer Bundesausschuss
Unterausschuss Methodenbewertung (UA MB)
Dr. Annette Reuter/Dr. Dietrich Sonntag
Postfach 120606
10596 Berlin

per E-Mail an: erprobung137e@g-ba.de
Nachrichtlich per E-Mail an: st-gba@awmf.org

Präsident
Prof. Dr. med. Thomas Dimpfl
Klinikum Kassel GmbH
Frauenklinik
Mönchebergstraße 41-43
D-34125 Kassel

Telefon: +49 (0) 561 980-3040
Telefax: +49 (0) 561 980-6947
E-Mail: presse@dggg.de

Kassel, den 26.08.2014

Beratungsverfahren zu Richtlinien zur Erprobung gemäß § 137e SGB V

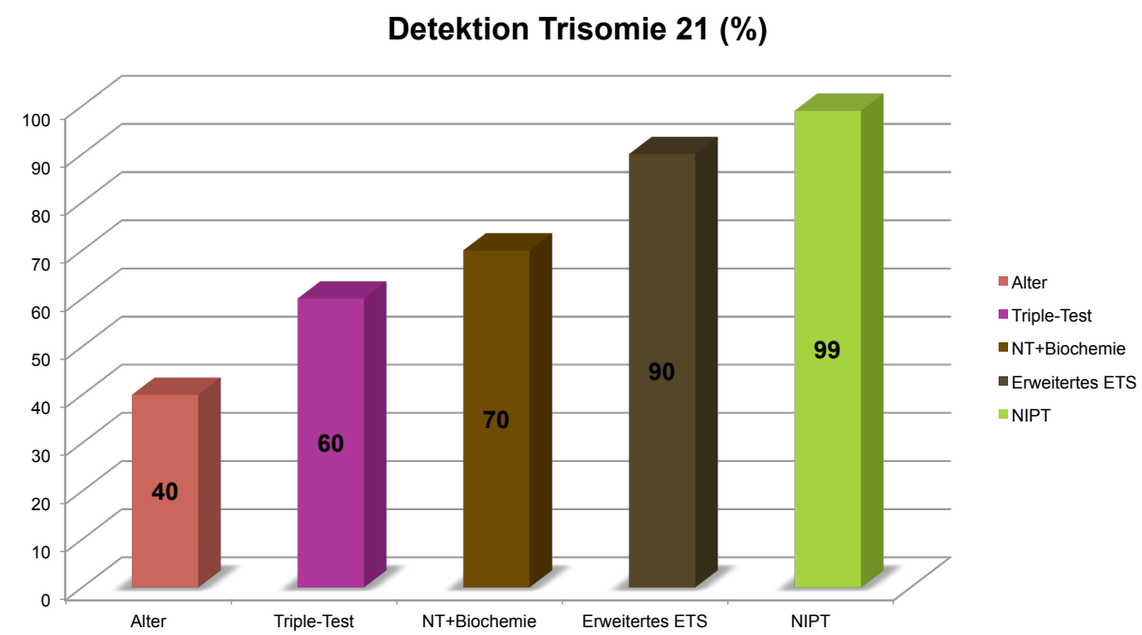
196. Stellungnahme der DGGG zur Nichtinvasiven Pränataldiagnostik zur Bestimmung des Risikos von fetaler Trisomie 21 mittels molekulargenetischer Tests

„Grundsätzlich schließt sich die DGGG daher der Stellungnahme der deutschen Gesellschaft für Humangenetik vom 12.11.2012 an, „dass die Untersuchung keiner Schwangeren vorenthalten werden kann bzw. allen Schwangeren verfügbar gemacht werden sollte“ (4).“

Stellungnahme der DGGG zur Nichtinvasiven Pränataldiagnostik zur Bestimmung des Risikos von fetaler Trisomie 21 mittels molekulargenetischer Tests
Wang J-C, Sahoo T, Schonberg S et al. Discordant noninvasive prenatal testing and cytogenetic results: a study of 109 consecutive cases. Genet Med 2015; 17: 234-236

PrenaTest® by lifecodexx	**Massively Parallel Signature Sequencing (PraenaTest, Prenatalis® NIPT, Maternit21plus, Verifi Pränatal Test)** Prinzip: Alle zirkulierenden zellfreien fetalen DNA-Fragmente werden sequenziert und amplifiziert. Die Zahl der sequenzierten DNA-Fragmente liegt im Bereich von Millionen.	**Trisomie 21, 18, 13** **Turner-Syndrom,** **Klinefelter-Syndrom,** **Triple-X-Syndrom** **XYY-Syndrom** Gemine ART (IVF,ICSI, Eizellspende* (*PraenatTest)) **Keine höhergradige Mehrlinge** **Keine Triploidie und Mikrodeletionssyndrom**	Ab 9+0 SSW. Analyse in Deutschland DR 99%, Falsch-Positiv-Rate 0,1% (für Trisomien (T) 21, 18 und 13)
Prenatalis®			Ab 10 SSW. Analyse Deutschland T 21 DR 99,14% T 18 DR 98,31% T 13 DR 98,15% X0 DR 95%
panorama™ prenatal test	**Directed Sequencing (sequenziert nur SNPs (Single nucleotide polymorphisms)** **(Panorama Prenatal Test)** Prinzip: Es werden Single nucleotide polymorphisms der Chromosomen 21, 18, 13 und der Geschlechtschromosomen X und Y sequenziert. Die Zahl der sequenzierten DNA-Fragmente liegt im Bereich von Tausenden.	**Trisomie 21, 18, 13** **Turner-Syndrom,** **Klinefelter-Syndrom,** **Triple-X-Syndrom** **XYY-Syndrom** ART (IVF,ICSI) **Triploidie** **Mikrodeletionssyndrome (DieGeorge Syndrom)** **Keine Gemini** **Keine Eizellspende**	Ab 9+0 SSW. Analyse in USA DR 99%, (für T 21, 18 und 13) X0 ca. 92 % DiGeorge 95,7%
Harmony™ PRENATAL TEST	**Chromosome-selective sequencing (Harmony Prenatal Test)** Prinzip: gezielte Sequenzierung nicht-polymorpher DNA der Chromosomen 21, 18, 13 und der Geschlechtschromosomen. Zahl der sequenzierten DNA-Fragmente liegt im Bereich von Hunderten.	**Trisomie 21, 18, 13** **Turner-Syndrom,** **Klinefelter-Syndrom,** **Triple-X-Syndrom** **XYY-Syndrom** Gemini ART (IVF,ICSI, Eizellspende) **Keine höhergradige Mehrlinge** **Keine Triploidie und Mikrodeletionssyndrom**	Ab 10+0 SSW. Analyse in Deutschland T 21 DR > 99% FPR < 0,1% T 18 DR > 98% FPR < 0,1% T 13 DR 8 von 10 FPR < 0,1%

- Die NIPT ist nicht als diagnostischer Test zu verstehen. Im Falle eines positiven Ergebnisses ist eine Bestätigung durch die invasive Diagnostik erforderlich
- NIPT belegt in Studien ihre Überlegenheit gegenüber den bisherigen Screeningverfahren sowohl in Hinblick auf Sensitivität, Vorhersagewerte und Reduktion der Eingriffs-bedingten Fehlgeburtsrate
  - (Schweizerische Beobachtungsstudie: Reduktion der invasiven Diagnostik infolge der Möglichkeit der Durchführung einer NIPT um 67% beobachtete)
- Bisher keine einheitlichen Standards bei der Implementierung der NIPT in die Praxisroutine der pränatalen Diagnostik



Peter Kozlowski Nicht-invasive Pränataldiagnostik
Dreiländertreffen Ultraschall Innsbruck 29. Oktober 2014

Maternale und fetale Risiken im I. Trimester

- 0,3 % Aneuploidien
- 4 % Malformationen
- 0,5% Gestose

bielefeldfertilitycenter
Ihr Kinderwunschteam

Thomas von Ostrowski
Gynäkologisches Symposium - Bielefeld 29.10.16
NIPT – Was ist möglich? Was ist nötig?

KINDERWUNSCH DORTMUND SIEGEN DORSTEN WUPPERTAL
STANDORT DORSTEN UND
PRÄNATALMEDIZIN DORSTEN

Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis

M. M. Gil[1], M. S. Quezada[1], R. Revello[1], R. Akolekar[1,2] andK. H. Nicolaides[1,2,*]
Article first published online: 1 FEB 2015
DOI: 10.1002/uog.14791
Copyright © 2015 ISUOG. Published by John Wiley & Sons Ltd

NIPT WAS KANN ES RICHTIG GUT?

	DR*	FPR
Trisomie 21	**99.2%** (95% CI, 98.5–99.6%)	**0.09%** (95% CI, 0.05–0.14%)

Auch in Kollektiven mit primär niedrigem bzw. durchschnittlichem Risiko!

Bianchi DW, Parker RL, Wentworth J et al. DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening. N Engl J Med 2014; 370: 799 – 808

NortonME,JacobssonB,SwamyGKetal.Cell-freeDNAAnalysisforNo- ninvasive Examination of Trisomy. N Engl J Med 2015

Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis

M. M. Gil[1], M. S. Quezada[1], R. Revello[1], R. Akolekar[1,2] andK. H. Nicolaides[1,2,*] Article first published online: 1 FEB 2015 DOI: 10.1002/uog.14791

bielefeldfertilitycenter
Ihr Kinderwunschteam

Thomas von Ostrowski
Gynäkologisches Symposium - Bielefeld 29.10.16
NIPT – Was ist möglich? Was ist nötig?

KINDERWUNSCH DORTMUND SIEGEN DORSTEN WUPPERTAL
STANDORT DORSTEN UND
PRÄNATALMEDIZIN DORSTEN

Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis

M. M. Gil[1], M. S. Quezada[1], R. Revello[1], R. Akolekar[1,2] andK. H. Nicolaides[1,2,*]
Article first published online: 1 FEB 2015
DOI: 10.1002/uog.14791
Copyright © 2015 ISUOG. Published by John Wiley & Sons Ltd

NIPT WAS KANN ES NOCH?

Trisomie 18	**96.3%** (95% CI, 94.3–97.9%)	**0.13%** (95% CI, 0.07–0.20)

Auch in Kollektiven mit primär niedrigem bzw. durchschnittlichem Risiko!

Bianchi DW, Parker RL, Wentworth J et al. DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening. N Engl J Med 2014; 370: 799 – 808

NortonME,JacobssonB,SwamyGKetal.Cell-freeDNAAnalysisforNo- ninvasive Examination of Trisomy. N Engl J Med 2015

Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis

M. M. Gil[1], M. S. Quezada[1], R. Revello[1], R. Akolekar[1,2] andK. H. Nicolaides[1,2,*] Article first published online: 1 FEB 2015 DOI: 10.1002/uog.14791

bielefeldfertilitycenter
Ihr Kinderwunschteam

Thomas von Ostrowski
Gynäkologisches Symposium - Bielefeld 29.10.16
NIPT – Was ist möglich? Was ist nötig?

KINDERWUNSCH DORTMUND SIEGEN DORSTEN WUPPERTAL
STANDORT DORSTEN UND
PRÄNATALMEDIZIN DORSTEN

Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis

M. M. Gil[1], M. S. Quezada[1], R. Revello[1], R. Akolekar[1,2] andK. H. Nicolaides[1,2,*]
Article first published online: 1 FEB 2015
DOI: 10.1002/uog.14791
Copyright © 2015 ISUOG. Published by John Wiley & Sons Ltd

NIPT WO SOLLTE WIR VORSICHTIG SEIN!

Trisomie 13	**91.0%** (95% CI, 85.0–95.6%)	**0.13%** (95% CI, 0.05–0.26%)
Monosomie X	**90.3%** (95% CI, 85.7–94.2%)	**0.23%** (95% CI, 0.14–0.34%)

Auch in Kollektiven mit primär niedrigem bzw. durchschnittlichem Risiko!

Bianchi DW, Parker RL, Wentworth J et al. DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening. N Engl J Med 2014; 370: 799 – 808

NortonME,JacobssonB,SwamyGKetal.Cell-freeDNAAnalysisforNo- ninvasive Examination of Trisomy. N Engl J Med 2015

Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis

M. M. Gil[1], M. S. Quezada[1], R. Revello[1], R. Akolekar[1,2] andK. H. Nicolaides[1,2,*] Article first published online: 1 FEB 2015 DOI: 10.1002/uog.14791

bielefeldfertilitycenter
Ihr Kinderwunschteam

Thomas von Ostrowski
Gynäkologisches Symposium - Bielefeld 29.10.16
NIPT – Was ist möglich? Was ist nötig?

KINDERWUNSCH DORTMUND SIEGEN DORSTEN WUPPERTAL
STANDORT DORSTEN UND
PRÄNATALMEDIZIN DORSTEN

Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis

M. M. Gil[1], M. S. Quezada[1], R. Revello[1], R. Akolekar[1,2] andK. H. Nicolaides[1,2,*]
Article first published online: 1 FEB 2015
DOI: 10.1002/uog.14791
Copyright © 2015 ISUOG. Published by John Wiley & Sons Ltd

NIPT WO SOLLTE WIR VORSICHTIG SEIN!

Monosomie X	**90.3%** (95% CI, 85.7–94.2%)	**0.23%** (95% CI, 0.14–0.34%)
47, XXY **47, XXX** **u.a.**	**93.0%** (95% CI, 85.8–97.8%)	**0.14%** (95% CI, 0.06–0.24%)

Der Einsatz von NIPT zum Screening auf Aneuploidien der Geschlechtschromosomen und auf Mikrodeletionssyndrome kann auf Basis der vorliegenden Daten derzeit nicht uneingeschränkt empfohlen werden.

Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis

M. M. Gil[1], M. S. Quezada[1], R. Revello[1], R. Akolekar[1,2] andK. H. Nicolaides[1,2,*]
Article first published online: 1 FEB 2015
DOI: 10.1002/uog.14791
Copyright © 2015 ISUOG. Published by John Wiley & Sons Ltd

NIPT ZWILLINGE?

Trisomie 21 Gemini	**93,7 %** (95% CI, 83.6–99.2%)	**0,23 %** (95% CI, 0.00–0.92%)

Zeigt kaum Vorteile gegenüber Ersttrimesterscreening.
ETS + Zusatzmarker ist der NIPT unterlegen.

M. M. Gil[1], M. S. Quezada[1], R. Revello[1], R. Akolekar[1,2] andK. H. Nicolaides[1,2,*] Article first published online: 1 FEB 2015 DOI: 10.1002/uog.14791, Copyright © 2015 ISUOG. Published by John Wiley & Sons Ltd

bielefeldfertilitycenter
Ihr Kinderwunschteam

Thomas von Ostrowski
Gynäkologisches Symposium - Bielefeld 29.10.16
NIPT – Was ist möglich? Was ist nötig?

KINDERWUNSCH DORTMUND SIEGEN DORSTEN WUPPERTAL
STANDORT DORSTEN UND
PRÄNATALMEDIZIN DORSTEN

Ultrasound Obstet Gynecol 2016; **48**: 446–451
Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). **DOI:** 10.1002/uog.15829

First-trimester screening for trisomies 18 and 13, triploidy and Turner syndrome by detailed early anomaly scan

P. WAGNER*, J. SONEK†‡, M. HOOPMANN*, H. ABELE* and K. O. KAGAN*

**Department of Obstetrics and Gynaecology, University of Tuebingen, Tuebingen, Germany; †Fetal Medicine Foundation USA, Dayton, OH, USA; ‡Division of Maternal Fetal Medicine, Wright State University, Dayton, OH, USA*

ULTRASCHALL

Conclusion *A detailed anomaly scan at 11–13 weeks' gestation can identify about 95% of fetuses with trisomy 18, trisomy 13, triploidy and Turner syndrome.* *Copyright © 2015 ISUOG. Published by John Wiley & Sons Ltd.*

NIPT

Trisomie 18	**96.3%** (95% CI, 94.3–97.9%)	**0.13%** (95% CI, 0.07–0.20)
Trisomie 13	**91.0%** (95% CI, 85.0–95.6%)	**0.13%** (95% CI, 0.05–0.26%)
Monosomie X	**90.3%** (95% CI, 85.7–94.2%)	**0.23%** (95% CI, 0.14–0.34%)

NIPT ZU WELCHEM ZEITPUNKT EINSETZEN?

Fetal Medicine Foundation UK

Ab 10 + 0 SSW.

SSL mindestens 32 mm. Befundbesprechung nach Ersttrimester-Screening mittels Ultraschall und Messung der fetalen Nackentransparenz.

Kontingentes Modell:

Testergebnis im Intermediär Bereich führt zur NIPT

Detaillierter Ultraschall inkl. Nackentransparenzmessung zw. 11+0 - 13+6 SSW mit NIPT kombiniert.

Bei sonografischem Nachweis einer Nackentransparenz > 3.5 mm oder einer fetalen Fehlbildung wird unabhängig vom cfDNA-Testergebnis eine invasive pränatale genetische Diagnostik inklusive Micro- array-Analyse empfohlen.

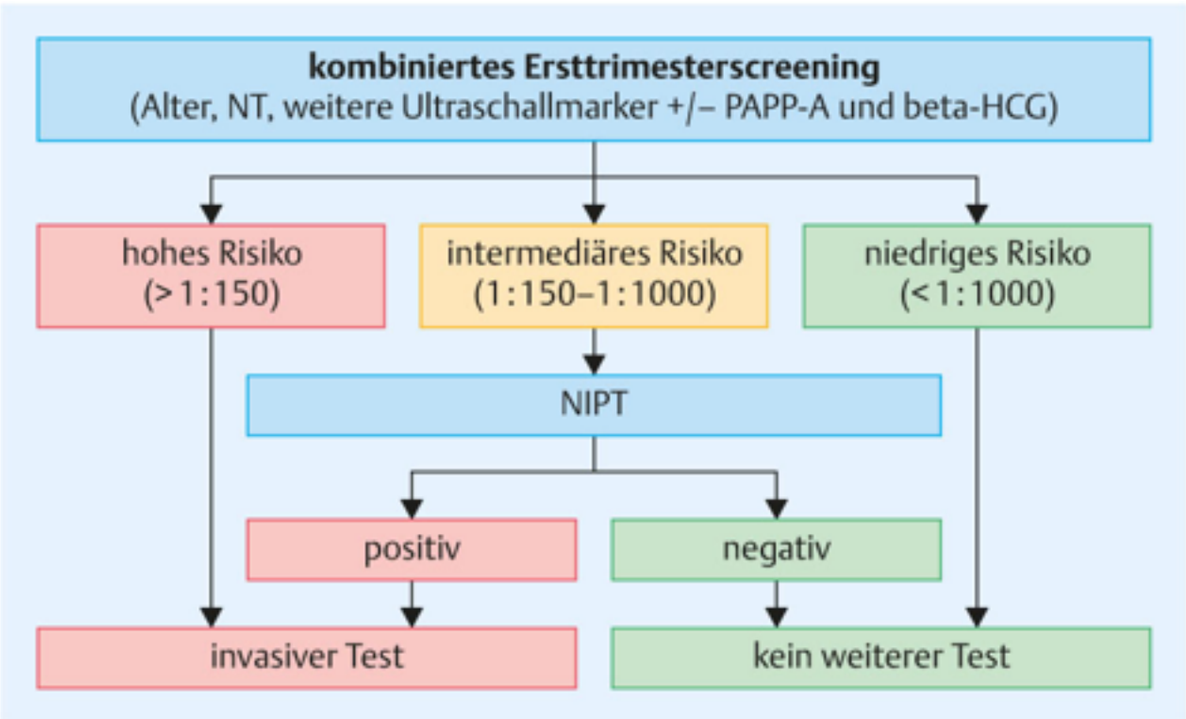
Die potentielle Gefährdung des Kindes durch invasive Eingriffe im Rahmen der pränatalen Diagnostik erfordert es, die Möglichkeiten einer risikoarmen Diagnostik voll auszuschöpfen“ (Deutsches Ärzteblatt, 95, Heft 50, 11.12.1998)

Gil MM, Quezada MS, Bregant B et al. Implementation of maternal blood cell-free DNA testing in early screening for aneuploidies. Ultra- sound Obstet Gynecol 2013; 42: 34 – 40

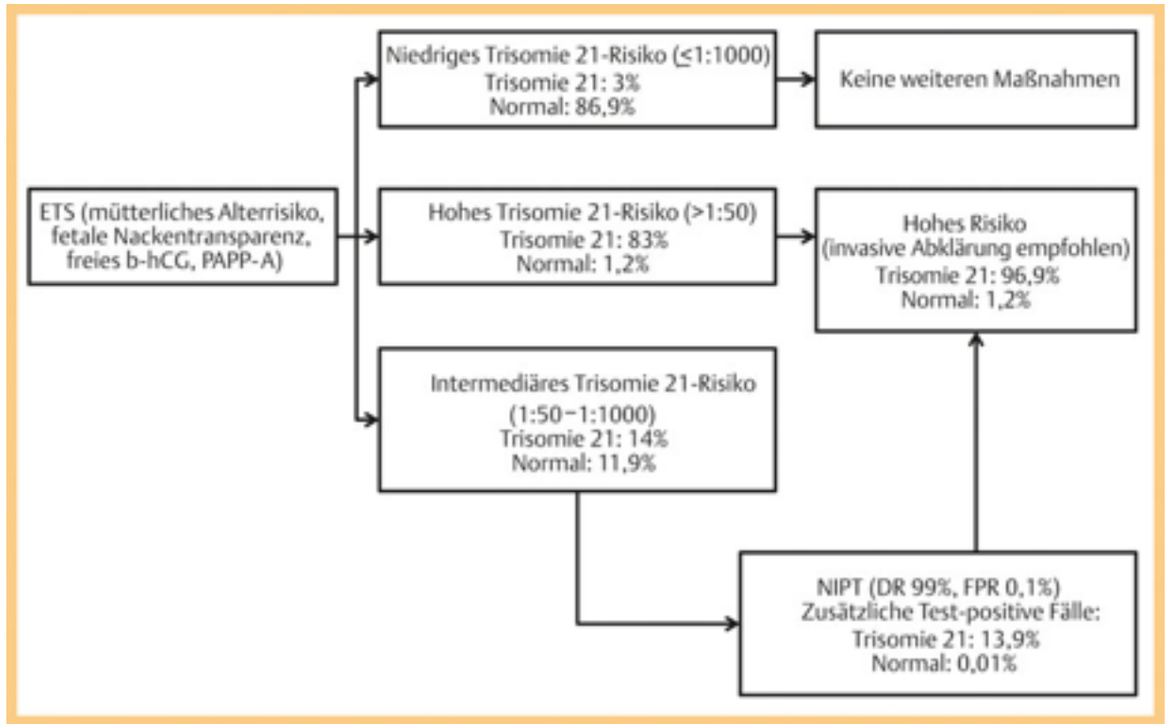
Lund IC, Christensen R, Petersen OB et al. Chromosomal microarray in fetuses with increased nuchal translucency. Ultrasound Obstet Gyne- col 2015; 45: 95 – 100

Kontingentes Modell: Ein Testergebnis im Intermediärbereich würde eine NIPT nach sich ziehen.

Die FMF UK berichtet, dass etwa 12,5% der gescreenten Schwangeren in diesem Bereich zu erwarten sind.



Flow chart contingent screening NIPT (mod. nach Nikolaides 2014).|



Ultraschall in Med 2014; 35(3): 229-236 DOI: 10.1055/s-0034-1366353 Review © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York
Combined First Trimester Screening and Cell-Free Fetal DNA – "Next Generation Screening" Kombiniertes Ersttrimesterscreening und zellfreie fetale DNA – „Next Generation Screening" K. O. Kagan1, B. Eiben2, P. Kozlowski3

Frauenheilkunde up2date 2015; 9(04): 243-255 DOI: 10.1055/s-0033-1358169 Geburtshilfe und Perinatalmedizin Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York Update Ersttrimesterscreening – was ist neu in 2015? Stefan Verlohren

RossiAC,PrefumoF.Accuracyofultrasonographyat11-14weeksofge- station for detection of fetal structural anomalies: a systematic review. Obstet Gynecol 2013; 122: 1160 – 1167

Drei Länder – Empfehlung zum Einsatz von Nicht-invasiven pränatalen Tests (NIPT) zur Analyse der zellfreien DNA (cfDNA) im mütterlichen Blut zum Screening auf fetale Chromosomenstörungen in der klinischen PraxisCell-Free DNA Testing for Fetal Chromosomal Anomalies in clinical practice: Aus- trian-German-Swiss Recommendations for non-invasive prenatal tests (NIPT) Authors M. Schmid1, P. Klaritsch2, W. Arzt3, T. Burkhardt4, H. C. Duba5, M. Häusler2, E. Hafner7, U. Lang2, B. Pertl6, M. Speicher8, H. Steiner9, S. Tercanli10, E. Merz11, K. S. Heling12, B. Eiben13

Definition des intermediären Risiko

Unklarheit besteht weiterhin, welcher Wert für das adjustierte Risiko nach Combined-Test eine Indikation für NIPT darstellt.

- Konsensus: Cut-off von > 1:1000 bzw. > 1:500 (FMF-D).
  (Cut-off von > 1:1000) theoretisch eine Detektionsrate für Trisomie 21 von > 97 %
- Großzügigeren Indikationsstellung, auch ein adjustiertes **Risiko von > 1:2500 wird überlegt.**
- Fachgesellschaften wie die Deutsche Gesellschaft für Humangenetik empfehlen, NIPT keiner Schwangeren vorzuenthalten.

Die Frage des Cut- offs ist eine individuelle Entscheidung und muss mit den Schwangeren besprochen werden.

Publizierte klinische Studien oder eindeutige internationale Empfehlungen dazu gibt es derzeit nicht!

Benn P, Borell A, Chiu R et al. Position statement from the Aneuploidy Screening Committee on behalf of the Board of the International Socie- ty for Prenatal Diagnosis. Prenat Diagn 2013; 33: 622 – 629

Merz E, Thode C, Eiben B et al. Individualized correction for maternal weight in calculating the risk of chromosomal abnormalities with first-trimester screening data. Ultraschall in Med 2011; 32: 33 – 39

Kagan KO, Wright D, Nicolaides KH. First-trimester contingent scree- ning for trisomies 21, 18 and 13 by fetal nuchal translucency and ductus venosus flow and maternal blood cell-free DNA testing. Ultra- sound Obstet Gynecol 2015; 45: 42 – 47

Nicolaides KH, Syngelaki A, Poon LC et al. First-trimester contingent creening for trisomies 21, 18 and 13 by biomarkers and maternal blood cell-free DNA testing. Fetal Diagn Ther 2014; 35: 185 – 192

Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik (GfH) zur Analyse fetaler DNA aus dem mütterlichen Blut. http://www. gfhev.de/de/leitlinien/LL_und_Stellungnahmen/

Kagan KO, Hoopmann M, Hammer R et al. Screening auf Chromoso- menstörungen mittels Ersttrimester-Screening und non-invasive pre- natal Testing. Ultraschall in Med 2015; 36: 40 – 46

Drei Länder – Empfehlung zum Einsatz von Nicht-invasiven pränatalen Tests (NIPT) zur Analyse der zellfreien DNA (cfDNA) im mütterlichen Blut zum Screening auf fetale Chromosomenstörungen in der klinischen PraxisCell-Free DNA Testing for Fetal Chromosomal Anomalies in clinical practice: Aus- trian-German-Swiss Recommendations for non-invasive prenatal tests (NIPT) Authors M. Schmid1, P. Klaritsch2, W. Arzt3, T. Burkhardt4, H. C. Duba5, M. Häusler2, E. Hafner7, U. Lang2, B. Pertl6, M. Speicher8, H. Steiner9, S. Tercanli10, E. Merz11, K. S. Heling12, B. Eiben13

bielefeldfertilitycenter
Ihr Kinderwunschteam

Thomas von Ostrowski
Gynäkologisches Symposium - Bielefeld 29.10.16
NIPT – Was ist möglich? Was ist nötig?

KINDERWUNSCH DORTMUND SIEGEN DORSTEN WUPPERTAL
STANDORT DORSTEN UND
PRÄNATALMEDIZIN DORSTEN

Ultrasound Obstet Gynecol 2016; **47**: 45–52
Published online 26 October 2015 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). **DOI:** 10.1002/uog.15783

Clinical implementation of routine screening for fetal trisomies in the UK NHS: cell-free DNA test contingent on results from first-trimester combined test

M. M. GIL*, R. REVELLO*, L. C. POON*, R. AKOLEKAR*† and K. H. NICOLAIDES*
**Harris Birthright Research Centre for Fetal Medicine, King's College Hospital, London, UK; †Department of Fetal Medicine, Medway Maritime Hospital, Gillingham, Kent, UK*

Conclusions *Screening for fetal trisomies by cfDNA analysis of maternal blood, contingent on the results of the combined test, can be implemented easily in routine clinical practice. In the high-risk group from the combined test, most but not all women chose cfDNA testing rather than invasive testing. Performance of screening for trisomy 21 was superior by the cfDNA test than by the combined test. However, prenatal detection of trisomies and pregnancy outcome depend not only on performance of screening tests but also on parental choice.* *Copyright © 2015 ISUOG. Published by John Wiley & Sons Ltd.*

bielefeldfertilitycenter
Ihr Kinderwunschteam

Thomas von Ostrowski
Gynäkologisches Symposium - Bielefeld 29.10.16
NIPT – Was ist möglich? Was ist nötig?

KINDERWUNSCH DORTMUND SIEGEN DORSTEN WUPPERTAL
STANDORT DORSTEN UND
PRÄNATALMEDIZIN DORSTEN

Ultrasound Obstet Gynecol 2016; **47**: 38–44
Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). **DOI:** 10.1002/uog.15820

Risk of fetal loss associated with invasive testing following combined first-trimester screening for Down syndrome: a national cohort of 147 987 singleton pregnancies

C. B. WULFF*†, T. A. GERDS‡, L. RODE*§, C. K. EKELUND*, O. B. PETERSEN¶, A. TABOR*† and the Danish Fetal Medicine Study Group

**Center of Fetal Medicine, Department of Obstetrics, Copenhagen University Hospital, Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark; †Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark; ‡Section of Biostatistics, Department of Public Health, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark; §Department of Clinical Biochemistry, Copenhagen University Hospital, Herlev and Gentofte Hospital, Copenhagen, Denmark; ¶Fetal Medicine Unit, Department of Obstetrics and Gynecology, Aarhus University Hospital, Skejby, Denmark*

CVS: Risiko einer Fehlgeburt: 0,08% (95% CI, -0,64; 0,47) in 3 Tagen und 0,21% (95% CI, -0,58; 0,15) auf 21 Tagen.
CVS: Risiko einer Totgeburt: 0,18% (95% CI, -0,50; 0,13) in 3 Tagen und 0,27% (95% CI, -0,58; 0,04) auf 21 Tagen.

AC: Risiko einer Fehlgeburt: Auf 28 Tagen 0,56% (95% CI, -0,21; 1,33).
Totgeburt 0,09% (95% CI war, -0,39; 0,58) auf 42 Tage.

Fazit: Weder CVS noch AC wurde mit einem erhöhten Risiko für eine Fehlgeburt oder Totgeburt verbunden.
Diese Ergebnisse zeigen, dass das Verfahren im Zusammenhang mit Risiko von CVS und AC sehr gering ist.

Beratungskonzept überprüfen?

Limitationen der NIPT-Methodik

Mindestkonzentration an cffDNA (fetale Fraktion)

8 % NIPT zeigen kein Ergebnis (Mindestkonzentration an cffDNA im mütterlichen Blut < 4%)

Entscheidendes Kriterium für die Konzentration der cffDNA —> mütterliche Gewicht

Gewicht von 100 kg —> 7% der Untersuchungen zeigen keine ausreichende cffDNA-Konzentration. 0,3%. Bei einem Körpergewicht von 50 kg.

Gestationsalter und fetale Fraktion

Die Menge an cffDNA zwischen der 10. und 21. SSW steigt um 0,1% pro Woche an.
Ab 21. SSW 1 % pro Woche.

Zunehmende Streuung der Messwerte mit konsekutiver Erhöhung der Standardabweichung. Da die z-Werte ein Mehrfaches der Standardabweichung darstellen, werden diese bei niedriger cffDNA-Konzentration geringer ausfallen wodurch die Diskriminierungsfähigkeit des Tests abfällt. Neben dem Einfluss auf die z-Werte kann die cffDNA-Konzentration auch als Qualitätsparameter an sich gesehen werden. Carnick et al. berichteten von 4 von 212 Fällen mit Trisomie 21, die z-Werte unter 3,0 aufwiesen. In diesen Fällen lag die cffDNA-Konzentration zwischen 4 und 7%.“*

*Ultraschall in Med 2014; 35(3): 229-236 DOI: 10.1055/s-0034-1366353 Review © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York Combined First Trimester Screening and Cell-Free Fetal DNA – “Next Generation Screening” Kombiniertes Ersttrimesterscreening und zellfreie fetale DNA – „Next Generation Screening“ K. O. Kagan1, B. Eiben2, P. Kozlowski3

**Cenata GmbH

Ashoor G, Syngelaki A, Poon LCY et al. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11–13 weeks’ gestation: relation to maternal and fetal characteristics. Ultrasound Obstet Gynecol 2013; 41: 26-32

Canick JA, Palomaki GE, Kloza EM. Chitty LS, Bianchi DW. et al. editors The impact of maternal plasma DNA fetal fraction on next generation sequencing tests for common fetal aneuploidies. Prenat Diagn 2013; 33: 667-674

Palomaki GE, Deciu C, Kloza EM et al. DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as Down syndrome: an international collaborative study. Genet Med 2012; 14: 296-305

Wang E, Batey A, Struble C et al. Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. Prenat Diagn 2013; 33: 662-666

Limitationen der NIPT-Methodik

PRENATAL
DIAGNOSIS

Maternales Gewicht 160 kg. Erwartete fetale Fraktion 4 %

Verdünnungseffekt —> fetale Fraktion ↓
Mütterliches Alter —> fetale Fraktion ↓
Adipositas —> maternale Fraktion (apoptotische Fettgewebszellen) ↑

- fetale Fraktion <3%—> Detektionsraten Trisomie 21 < 50 %
- fetale Fraktion 4 % —> Detektionsraten Trisomie 21 62,1 %
- fetale Fraktion 6 % —> Detektionsraten Trisomie 21 97,6 %
- fetale Fraktion 8 % —> Detektionsraten Trisomie 21 99,0 %

The impact of maternal plasma DNA fetal fraction on next generation sequencing tests for common fetal aneuploidies

Limitationen der NIPT-Methodik

Diskordante Befunde zwischen cffDNA und invasiver Diagnostik

- „Bei einer missed abortion eines Geminus ist nicht auszuschließen, dass nicht noch zellfreie fetale DNA aus dieser Plazenta im mütterlichen Blut zu finden ist; sollte die Missed abortion durch eine Chromosomenstörung bedingt sein, wäre das Ergebnis ggf. falsch-positiv“**
  - Aktuelle Arbeit von Curnow et al. 2014, die u.a. zwei weitere Arbeiten zitiert von Futch et al. 2013 (15% der falsch-positiven Fälle auf vanishing twins zurückzuführen) und Porecco et al. 2014 (33% der falsch-positiven T21- Fälle -1 von 3 Fällen- auf vanishing twins zurückzuführen)

Gemini

- „Bei dichorialen Zwillingsschwangerschaften mit einem Feten mit Trisomie 21 und einem unauffälligen Feten ist die bisherige Studienlage nicht gut genug, um ein entsprechendes Verfahren zu empfehlen“**

Malignom mit Sekretion diskordanter DNA

- „Osborne et al. beschrieb einen Fall mit einer gleichzeitigen Trisomie 18 und 13 bei einem sonomorphologisch normalen und konsekutiv gesund geborenen Feten. Die nachgeburtliche Aufarbeitung ergab ein metastasiertes kleinzelliges Plattenepithelkarzinom vaginalen Ursprungs bei der Mutter“*

*Ultraschall in Med 2014; 35(3): 229-236 DOI: 10.1055/s-0034-1366353 Review © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York
Combined First Trimester Screening and Cell-Free Fetal DNA – “Next Generation Screening” Kombiniertes Ersttrimesterscreening und zellfreie fetale DNA – „Next Generation Screening“ K. O. Kagan1, B. Eiben2, P. Kozlowski3

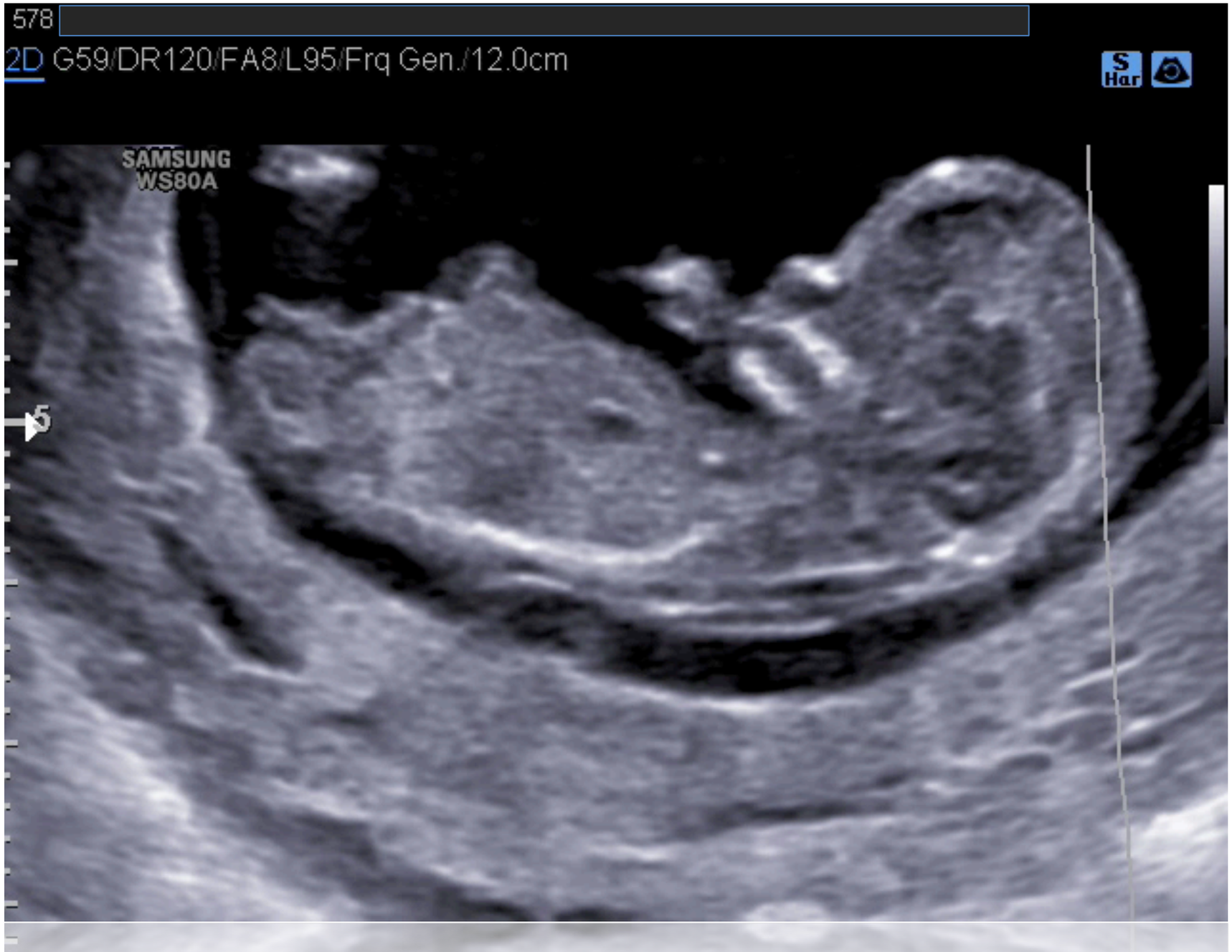
**Stellungnahme der DGGG zur Nichtinvasiven Pränataldiagnostik zur Bestimmung des Risikos von fetaler Trisomie 21 mittels molekulargenetischer Tests
Wang J-C, Sahoo T, Schonberg S et al. Discordant noninvasive prenatal testing and cytogenetic results: a study of 109 consecutive cases. Genet Med 2015; 17: 234-236

Osborne CM, Hardisty E, Devers P et al. Discordant noninvasive prenatal testing results in a patient subsequently diagnosed with metastatic disease. Prenat Diagn 2013; 33: 609-611

Kagan KO, Staboulidou I, Syngelaki A et al. The 11–13-week scan: diagnosis and outcome of holoprosencephaly, exomphalos and megacystis. Ultrasound Obstet Gynecol 2010; 36: 10-14

Training

Das Ersttrimester ist wegweisend für die weitere Diagnostik!



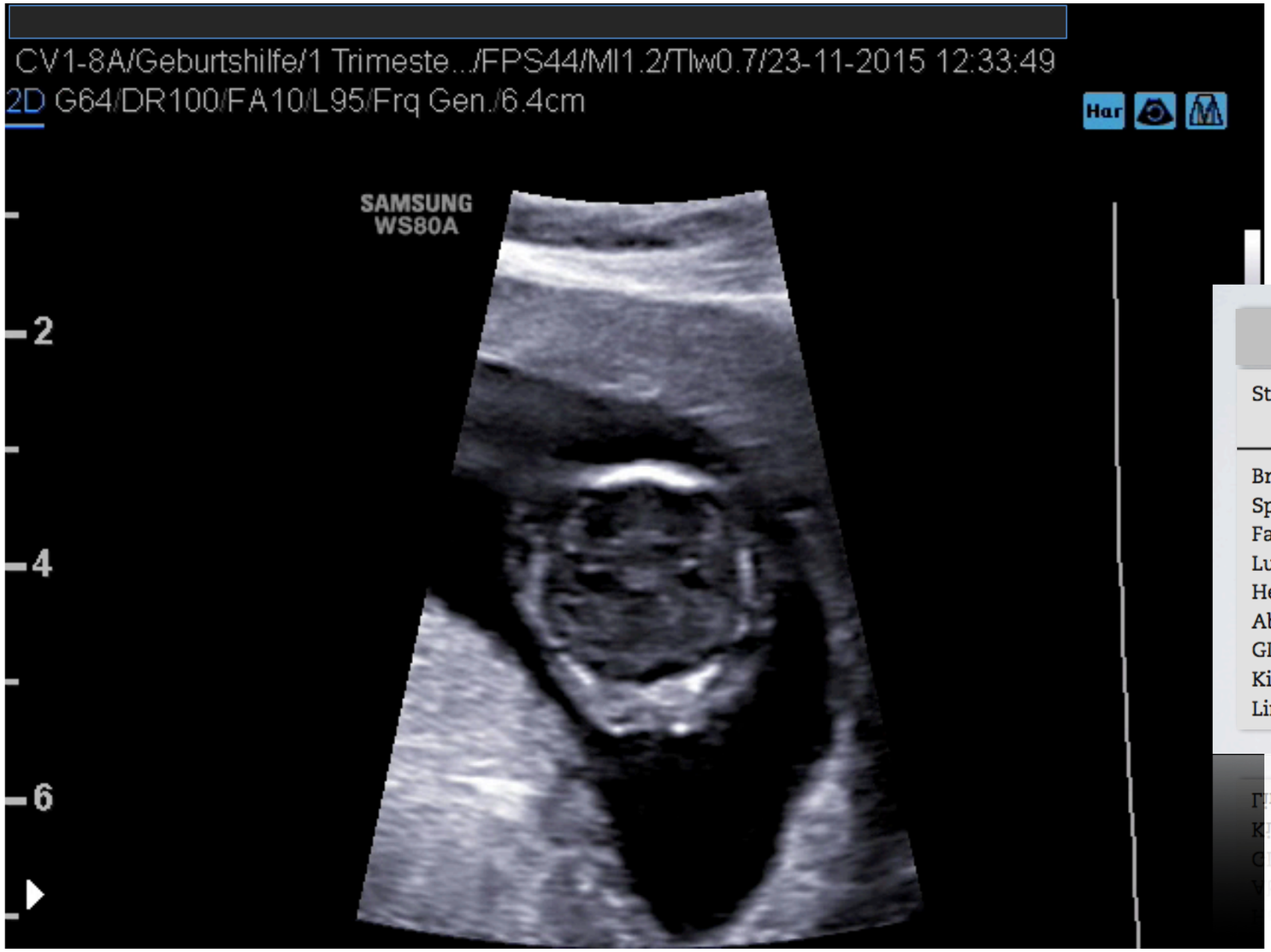
Das Ersttrimester ist wegweisend für die weitere Diagnostik!

Darstellbarkeit anatomischer Strukturen

Structures	11 weeks (%)	12 weeks (%)	13 weeks (%)	14 weeks (%)
Brain	90	99	100	100
Spine	92	99	100	100
Face	95	99	100	100
Lungs	96	99	99	100
Heart	83	96	98	98
Abdomen	99	100	100	100
GI	97	99	99	100
Kidneys	86	97	99	99
Limbs	99	100	100	100

Prof. Dr. Karl Oliver Kagan

Das Ersttrimester ist wegweisend für die weitere Diagnostik!



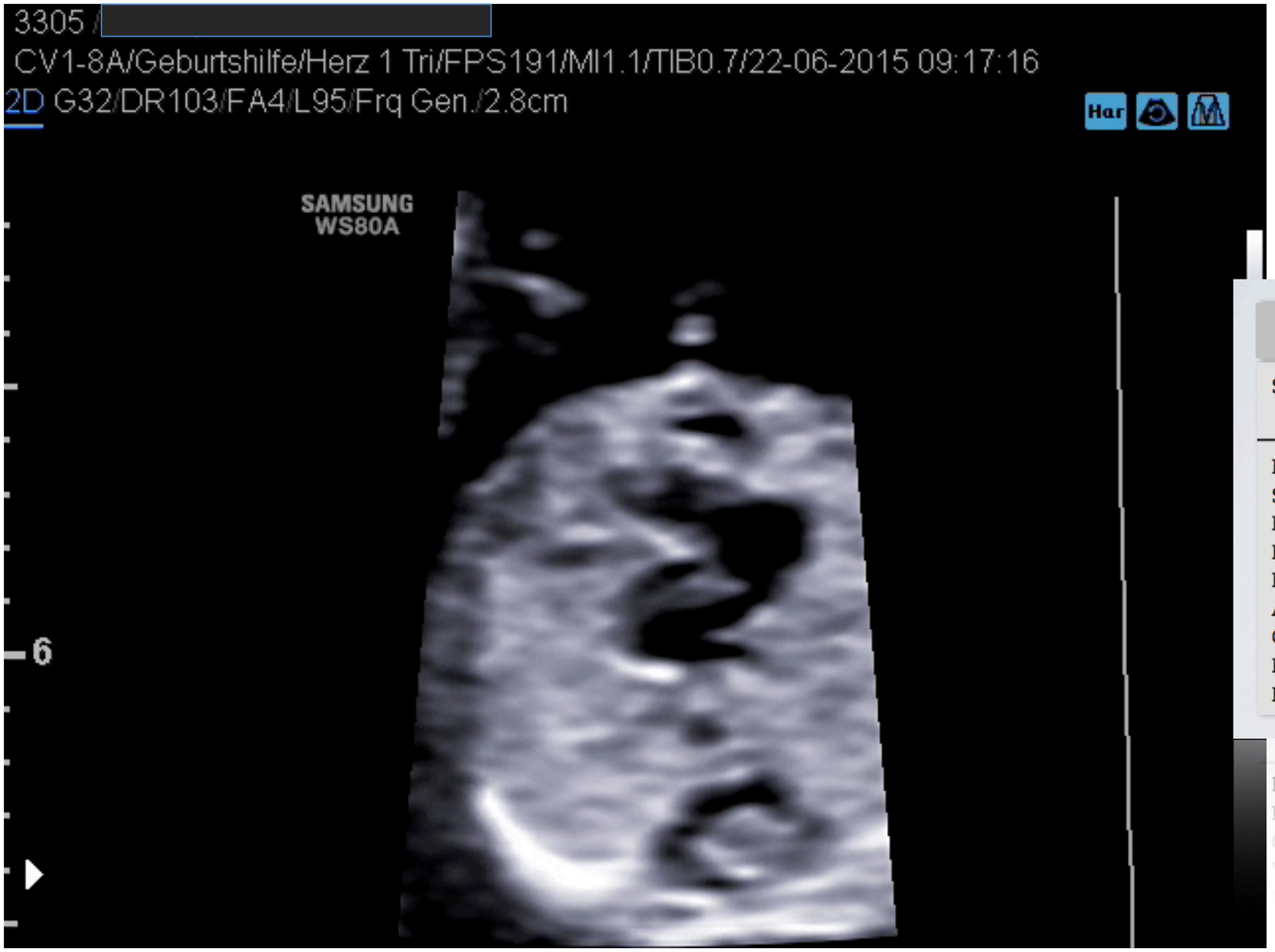
Darstellbarkeit anatomischer Strukturen

Structures	11 weeks (%)	12 weeks (%)	13 weeks (%)	14 weeks (%)
Brain	90	99	100	100
Spine	92	99	100	100
Face	95	99	100	100
Lungs	96	99	99	100
Heart	83	96	98	98
Abdomen	99	100	100	100
GI	97	99	99	100
Kidneys	86	97	99	99
Limbs	99	100	100	100

Prof. Dr. Karl Oliver Kagan

Das Ersttrimester ist wegweisend für die weitere Diagnostik!

Das Ersttrimester ist wegweisend für die weitere Diagnostik!



Darstellbarkeit anatomischer Strukturen

Structures	11 weeks (%)	12 weeks (%)	13 weeks (%)	14 weeks (%)
Brain	90	99	100	100
Spine	92	99	100	100
Face	95	99	100	100
Lungs	96	99	99	100
Heart	83	96	98	98
Abdomen	99	100	100	100
GI	97	99	99	100
Kidneys	86	97	99	99
Limbs	99	100	100	100

Prof. Dr. Karl Oliver Kagan

Das Ersttrimester ist wegweisend für die weitere Diagnostik!

Das Ersttrimester ist wegweisend für die weitere Diagnostik!

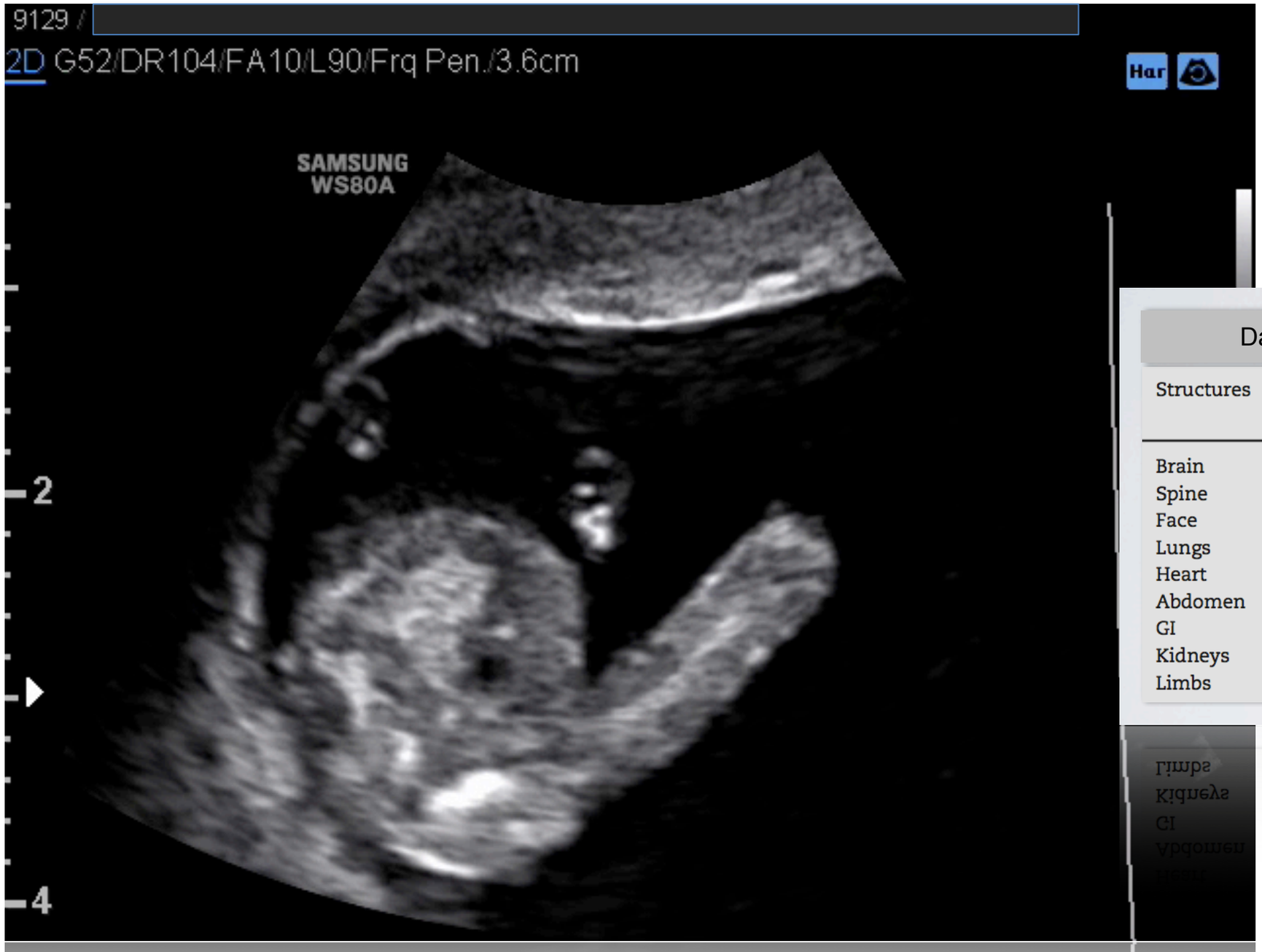
Darstellbarkeit anatomischer Strukturen

Structures	11 weeks (%)	12 weeks (%)	13 weeks (%)	14 weeks (%)
Brain	90	99	100	100
Spine	92	99	100	100
Face	95	99	100	100
Lungs	96	99	99	100
Heart	83	96	98	98
Abdomen	99	100	100	100
GI	97	99	99	100
Kidneys	86	97	99	99
Limbs	99	100	100	100

Prof. Dr. Karl Oliver Kagan

Das Ersttrimester ist wegweisend für die weitere Diagnostik!

Das Ersttrimester ist wegweisend für die weitere Diagnostik!



Darstellbarkeit anatomischer Strukturen

Structures	11 weeks (%)	12 weeks (%)	13 weeks (%)	14 weeks (%)
Brain	90	99	100	100
Spine	92	99	100	100
Face	95	99	100	100
Lungs	96	99	99	100
Heart	83	96	98	98
Abdomen	99	100	100	100
GI	97	99	99	100
Kidneys	86	97	99	99
Limbs	99	100	100	100

Prof. Dr. Karl Oliver Kagan

Das auffällige Ersttrimester!

Nasenbeinhypoplasie

Relatives Risiko Trisomie 21: 6,58

NIPT? erscheint möglich.

Diagnose: Trisomie 21

Invasive Diagnostik.

Amniozentese (AC)?
Chorionzottenbiopsie (CVS)?

CVS erscheint möglich.

Plazentamosaik Trisomie 21 in 2% der Fälle anzunehmen.

Das auffällige Ersttrimester!

Prominente Nackenfalte < 3,2 mm. Diskrete Mikrognathie

NIPT? erscheint möglich.

Diagnose: Trisomie 13

Invasive Diagnostik.

Amniozentese (AC)?
Chorionzottenbiopsie (CVS)?

CVS erscheint nicht möglich.

Plazentamosaik Trisomie 13 in 22% der Fälle anzunehmen.

AC bei 15+0 SSW: 46, XY, MicroArray unauffällig

Das auffällige Ersttrimester!

Dokumentation des zuweisenden Frauenarzt: keine Auffälligkeiten bei 10./11.SSW.

NIPT erstmalig:
10. SSW, Fraktion < 4%.
11. SSW, Fraktion < 4%.

NIPT? erscheint nicht möglich.

CAVE: Niedrige Fraktion kann Hinweis für Trisomie 13 od. 18 sein.

Invasive Diagnostik.

Amniozentese (AC)?
Chorionzottenbiopsie (CVS)?

CVS erscheint möglich.

Trisomie 13

bielefeldfertilitycenter
Ihr Kinderwunschteam

Thomas von Ostrowski
Gynäkologisches Symposium - Bielefeld 29.10.16
NIPT – Was ist möglich? Was ist nötig?

KINDERWUNSCH DORTMUND SIEGEN DORSTEN WUPPERTAL
STANDORT DORSTEN UND
PRÄNATALMEDIZIN DORSTEN

Ultrasound Obstet Gynecol 2016; **47**: 698–704
Published online 25 April 2016 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). **DOI:** 10.1002/uog.15851

Screening for trisomies by cell-free DNA testing of maternal blood: consequences of a failed result

R. REVELLO*, L. SARNO*, A. ISPAS*, R. AKOLEKAR*† and K. H. NICOLAIDES*

**Harris Birthright Research Centre for Fetal Medicine, King's College Hospital, London, UK; †Department of Fetal Medicine, Medway Maritime Hospital, Gillingham, Kent, UK*

The median fetal fraction in pregnancies with fetal trisomy 21 was not significantly different from that in unaffected pregnancies. In trisomies 18 and 13, the fetal fraction was significantly reduced and this decrease could be explained by the association of these trisomies with low serum PAPP-A and free β-hCG, reflecting the smaller placental source of fetal cfDNA in maternal blood.

NIPT kein Ergebnis?

- **Ausfallrate Down-Syndrom vs Normalkollektiv unterscheiden sich nicht.**
- **Ausfallrate bei Trisomie 13/18 vs Normalkollektiv bei Trisomie 13 und 18 deutlich höher.**

WICHTIG: ETS Befund, sonographischer Befund?

Das auffällige Ersttrimester!

Dokumentation des zuweisenden Frauenarzt: 10. SSW. Nackenfalte 2,3 mm.

NIPT erstmalig:
10. SSW, Fraktion < 6%.

NIPT? erscheint
möglich. Diagnose: unauffällig!

Invasive Diagnostik.

Amniozentese (AC)?
Chorionzottenbiopsie (CVS)?

CVS? Plazentamosaik X0 59%.
Allerdings auffällige Sonoanatomie.

CVS: Monosomie X
AC: Monosomie X. 10 Tage später
Missed abortion, massiver Hydrops f.

Plazentamosaik?

- Plazentamosaiken falsch positive Ergebnisse (1% CVS Studien).
  - Plazentamosaik Trisomie 21 2 %
  - Plazentamosaik Trisomie 18 4 %
  - Plazentamosaik Trisomie 13 22 %
  - Plazentamosaik Monosomie X 59 %
- Diskussion invasive Diagnostik in Zusammenhang mit Ultraschall Auffälligkeiten!
- Mütterliche chromosomale Rearrangements oder Mosaike.
- Cave!
  - KM Spende
  - Malignom mit Sekretion diskordanter DNA)

Editorial 417

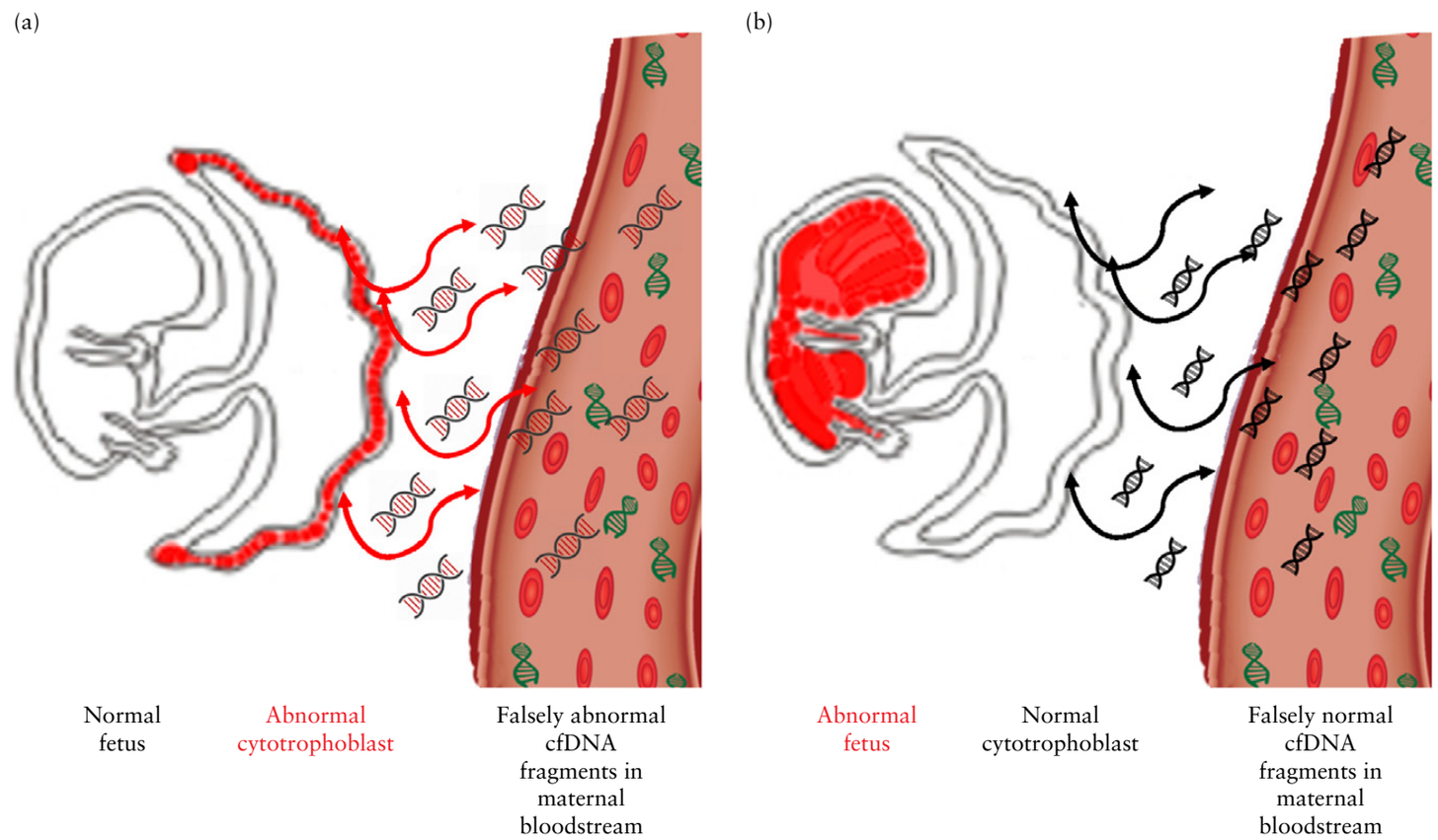


Figure 1 Schematic representation of the two opposing cytogenetic constitutions of the fetoplacental compartments that can potentially result in false-positive (a) and false-negative (b) results on cell-free DNA (cfDNA) testing. (a) Confined placental mosaicism Types 1 and 3, in which the genetic constitution of the fetus is normal but the cytotrophoblast is abnormal, resulting in falsely abnormal cfDNA fragments in the maternal bloodstream. (b) True fetal mosaicism Type 5, in which the genetic constitution of the fetus is abnormal and the cytotrophoblast is normal, resulting in falsely normal cfDNA fragments in the maternal bloodstream.

Implications of fetoplacental mosaicism on cell-free DNA testing: a review of a common biological phenomenon F. R. GRATI

Das auffällige Ersttrimester!

Dokumentation des zuweisenden Frauenarzt: 10. SSW. keine Auffälligkeiten.

NIPT erstmalig:
10. SSW, Fraktion 7%.

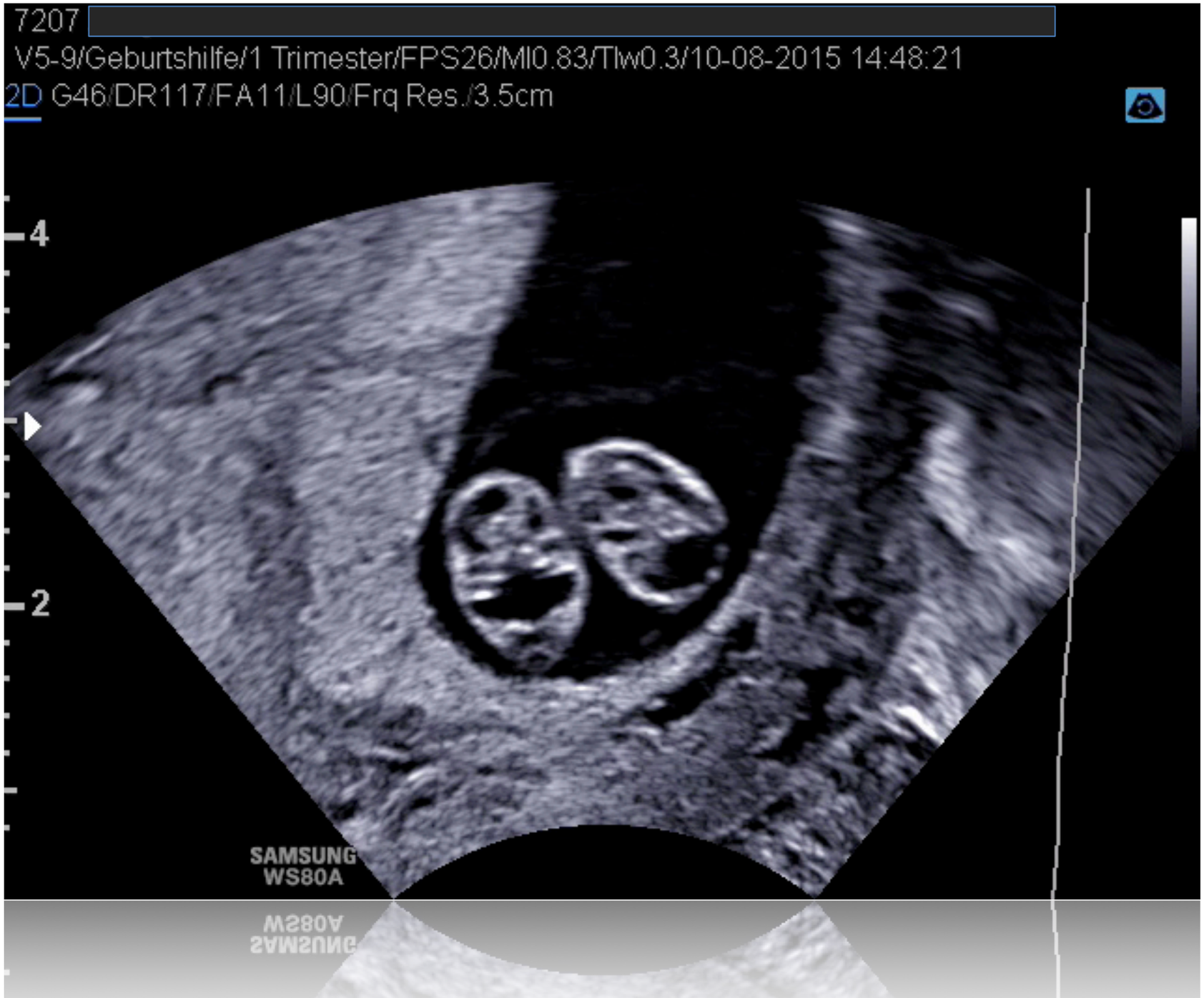
NIPT? erscheint möglich.
NIPT: unauffällig.

Invasive Diagnostik.

Nicht erforderlich.

Diagnose: Exenzephalus.

Das auffällige Ersttrimester!



Dokumentation des zuweisenden Frauenarzt: 10. SSW. keine Auffälligkeiten. Gemini Schwangerschaft

NIPT erstmalig:
10. SSW, Fraktion 8%.

NIPT? erscheint kritisch.
NIPT: unauffällig.

Invasive Diagnostik.

Nicht erforderlich.

Diagnose: Doppelfehlbildung

Das auffällige Ersttrimester!

Bicoriale Gemini. Prominente Nackenfalte 3 mm bei beiden Feten und Zusatzkriterien.

NIPT erstmalig:
12. SSW, Fraktion 9%.

NIPT? erscheint kritisch.
NIPT: 1. Fetus T21, 2. Fetus unauffällig

Invasive Diagnostik.

Erforderlich. CVS

Diagnose:
47, XY + 21, 47, XY + 21

Letters to the Editor

Table 1 Cell-free DNA results reported by two Belgian and two external laboratories for a woman with twin pregnancy with one fetus affected by trisomy 21 (Patient 1) and a non-pregnant woman (Patient 2)

	Patient 1		
Laboratory	*Test result*	*Fetal fraction and details*	*Patient 2 test result*
Belgian A	Normal	DNA fragment from a male fetus	No result
Belgian B	Normal	DNA fragment from a male fetus	Two normal females
External A	Normal	Fetal fraction, 10%	No result
External B	Normal	Fetal fraction, 16.4%	No result

E. Bevilacqua, M. Guizani, T. Cos Sanchez and J. C. Jani
Department of Obstetrics and Gynecology,
University Hospital Brugmann,
Université Libre de Bruxelles,
Brussels, Belgium
**Correspondence.*
(e-mail: jackjani@hotmail.com)
DOI: 10.1002/uog.14938

Patient 1: 32 a
Dichoriale Gemini. IVF.
Fetus 1: 47, XX+21
Fetus 2: 46, XY

Patientin 2: 42 a
Nicht Schwanger!

Die Labore wurden informiert, dass beide Proben von Schwangeren mit Zwillingsschwangerschaften (Probe 1 17. SSW, Probe 2 12. SSW) stammen. Die nicht Schwangere Patientin wurde aufgenommen um zu überprüfen, ob das Labor die fetale Fraktion für beide Feten oder als Gesamtfraktion bestimmt.

Cave:
Testversager bei Gemini häufiger, fetale Fraktion bei Gemini grundsätzlich geringer!

Und bei Einlingen?

Table 1 Non-invasive prenatal test (NIPT) results for two non-pregnant women from five commercial laboratories

	Patient 1		*Patient 2*	
Laboratory	*Test result available*	*Details*	*Test result available*	*Details*
Lab A	No	Insufficient fetal cfDNA for accurate NIPT evaluation	No	Insufficient fetal cfDNA for accurate NIPT evaluation
Lab B	No	Unable to report due to low fetal fraction (fetal fraction reported as 0.6%)	No	Unable to report due to low fetal fraction (fetal fraction reported as 0.6%)
Lab C	Yes	Negative, consistent with female fetus (fetal fraction 4.3% reported on request)	Yes	Negative, consistent with female fetus (fetal fraction 3.9% reported on request)
Lab D	Yes	No aneuploidy detected, two sex chromosomes (XX)	Yes	No aneuploidy detected, two sex chromosomes (XX)
Lab E	Yes	No aneuploidy detected, two sex chromosomes (XX)	Yes	No aneuploidy detected, two sex chromosomes (XX)

cfDNA, cell-free DNA.

Patient 1: 44 a
Information an Labor: 12. SSW Einling
Probe 09/2014
Nicht Schwanger!

Patientin 2: 44 a
Information an Labor: 12. SSW Einling
Probe 10/2014
Nicht Schwanger!

T. Takoudes* and B. Hamar
Boston Maternal-Fetal Medicine, Boston, MA, USA
**Correspondence.*
(e-mail: ttakoudes@bostonmfm.org)
DOI: 10.1002/uog.14715

NIPT bitte Merken?

- Qualifikation zur fachgebundenen genetischen Beratung gemäß § 7 Abs. 3 und § 23 Abs. 2 GenDG (GROßER SCHEIN).
- Das Ersttrimesterscreening ist wegweisend und muss Grundlage der Beratung sein.
- Indikationsgebiet insbesondere intermediäre Risiko nach ETS, aber auch individuelle Wünsche der Patientin beachten.
- Keine NIPT bei Malformationen oder Nackenfalte > 3,2 mm. Bei Wunsch der Patientin, schriftliche Dokumentation
- Ausfallrate bei Trisomie 18 und 13 vs. Normalkollektiv ist bei Trisomie 18 und 13 deutlich höher.
- Die Testgüte des NIPT für Trisomie 18 und Trisomie 13 liegt unter der für Trisomie 21.
- Adipositas limitiert die NIPT.
- Zwillingsschwangerschaften und vanishing twin limitiert die NIPT. Keine Daten zu Trisomie 18 und 13.
- Falsch positive Befunde sind unvermeidbar. Patientin über Möglichkeit des Plazentamosaik (1 %) aufklären.
- Amniozentese ist Methode der Wahl nach auffälliger NIPT. Das Punktionsrisiko ist gering.

KINDERWUNSCH DORTMUND SIEGEN DORSTEN WUPPERTAL
STANDORT DORSTEN UND

PRÄNATALMEDIZIN DORSTEN

Dr. med. Katharina Möller-Morlang [1,2]
Dr. med. Thomas von Ostrowski [1,3]

Fachärzte für Frauenheilkunde und Geburtshilfe [1]
Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin [2]
Tätigkeitschwerpunkt Pränatalmedizin (DEGUM II) [3]

Südwall 15
46282 Dorsten

Telefon 02362 27001
Telefax 02362 27002

www.praenatal-dorsten.de
www.kinderwunsch-dorsten.de

Berufsausübungsgemeinschaft Dr. med. Katharina Möller-Morlang, Dr. med. Thomas von Ostrowski Partnerschaft-Fachärzte für Frauenheilkunde und Geburtshilfe*, Sitz Dorsten, Amtsgericht Essen, PR 2553

*** Im Rahmen der vertragsärztlichen und in Teilen der privatärztlichen Tätigkeit zusammengeschlossen mit der Kinderwunschzentrum Prof. Dr. Dieterle, Dr. Neuer, Prof. Dr. Greb MVZ Ärzte Partnerschaft, Dortmund, sowie mit Prof. Dr. med. Stefan Dieterle, Wuppertal, zur überörtlichen Berufsausübungsgemeinschaft Kinderwunsch Dortmund, Siegen, Dorsten, Wuppertal GbR**

Herzlichen Dank für Ihre Aufmerksamkeit