

Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik

Vorlesung: Molekulare Diagnostik



QR Code / Link dieser Vorlesung:

www.klichi.uni-muenster.de/folien

Wintersemester 2022/23

Dr. rer. nat. Hartmut Schmidt

Centrum für Laboratoriumsmedizin

– Zentrallaboratorium –

Universitätsklinikum Münster

Albert-Schweitzer-Campus 1

D-48149 Münster

Tel.: 0251 83-47226

Fax: 0251 83-47225

zlab-lehre.uni-muenster.de

Hartmut.Schmidt-ZL@ukmuenster.de

Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik

Vorlesung: Molekulare Diagnostik



Dr. rer. nat. Hartmut Schmidt

Centrum für Laboratoriumsmedizin

– Zentrallaboratorium –

Universitätsklinikum Münster

Albert-Schweitzer-Campus 1

D-48149 Münster

Tel.: 0251 83-47226

Fax: 0251 83-47225

zlab-lehre.uni-muenster.de

Hartmut.Schmidt-ZL@ukmuenster.de

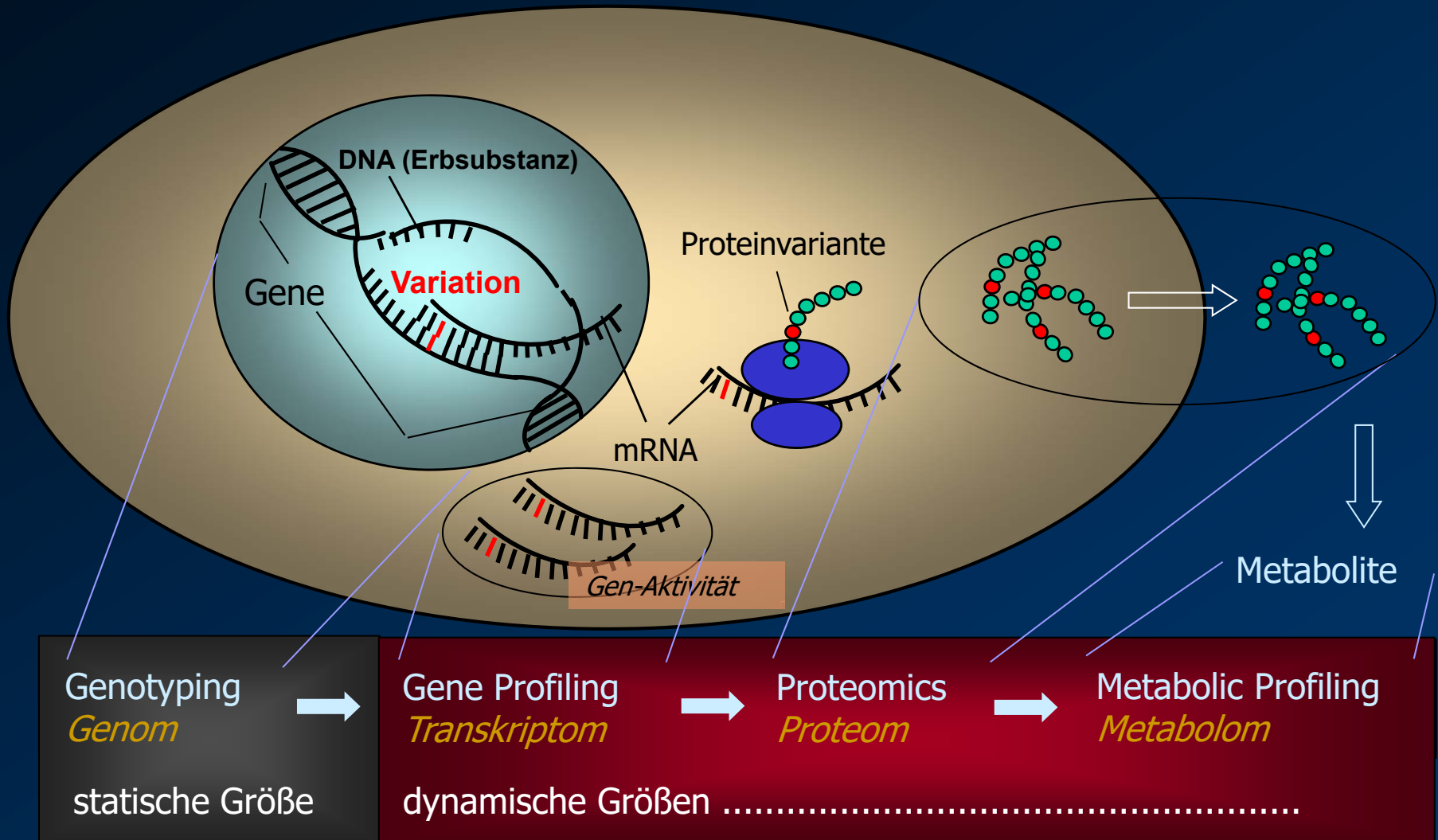
QR Code / Link dieser Vorlesung:

www.klichi.uni-muenster.de/folien

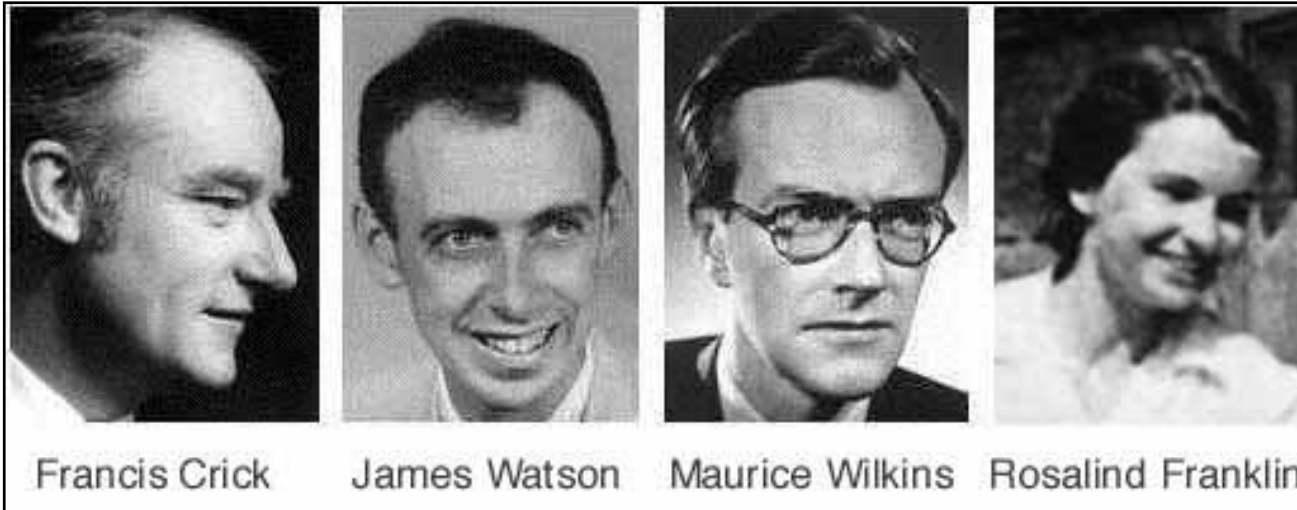
Wintersemester 2021/22



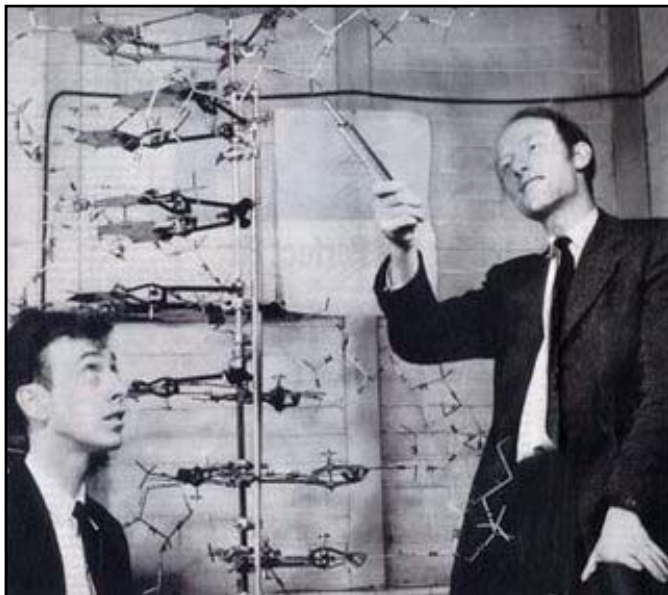
"Omics"-Ansatz: die molekulare Biologie der Zelle



Aufklärung der DNA-Doppelhelix Struktur 1953



Nobelpreis 1962



Die Röntgenbeugungsdiagramme der DNA durch Franklin und Wilkins und deren mathematische Analyse trugen wesentlich zur Aufklärung der DNA-Doppelhelixstruktur bei und bestätigten das theoretische Modell von James Watson und Francis Crick .

Der humane genetische Code ist endlich entschlüsselt !

2000

Die postgenomische Zeit



Venter/Collins

Celera Diagnostics

Über 99,9% der 3,2 Milliarden Bp sind nun bekannt!

Die Rohdaten aus dem Humangenomprojekt sind frei verfügbar



THE WHITE HOUSE
Office of the Press Secretary

For Immediate Release March 14, 2000

REMARKS BY THE PRESIDENT
AT NATIONAL MEDAL OF SCIENCE AWARD CEREMONY

The East Room

3:23 P.M. EST

“Today, we [pledge] to lead a global effort to make the raw data from DNA sequencing available to scientists everywhere, to benefit people everywhere.”

„Paradise lost“: nicht so unterschiedlich wie wir es gerne hätten



Caenorhabditis elegans
46% Homologie
des Proteoms



Drosophila melanogaster
61% Homologie
des Proteoms



Gleichheit zum Schimpansen auf
DNA-Ebene: etwa 99%

Probenmaterial für die Molekulardiagnostik

Geeignet

- Vollblut
- Plasma
- Serum
- *buffy coat*
- Knochenmark
- Punktaten
- Lymphozyten
- Zellkulturen
- Geweben
- forensische Proben
- Cerebrospinalflüssigkeit

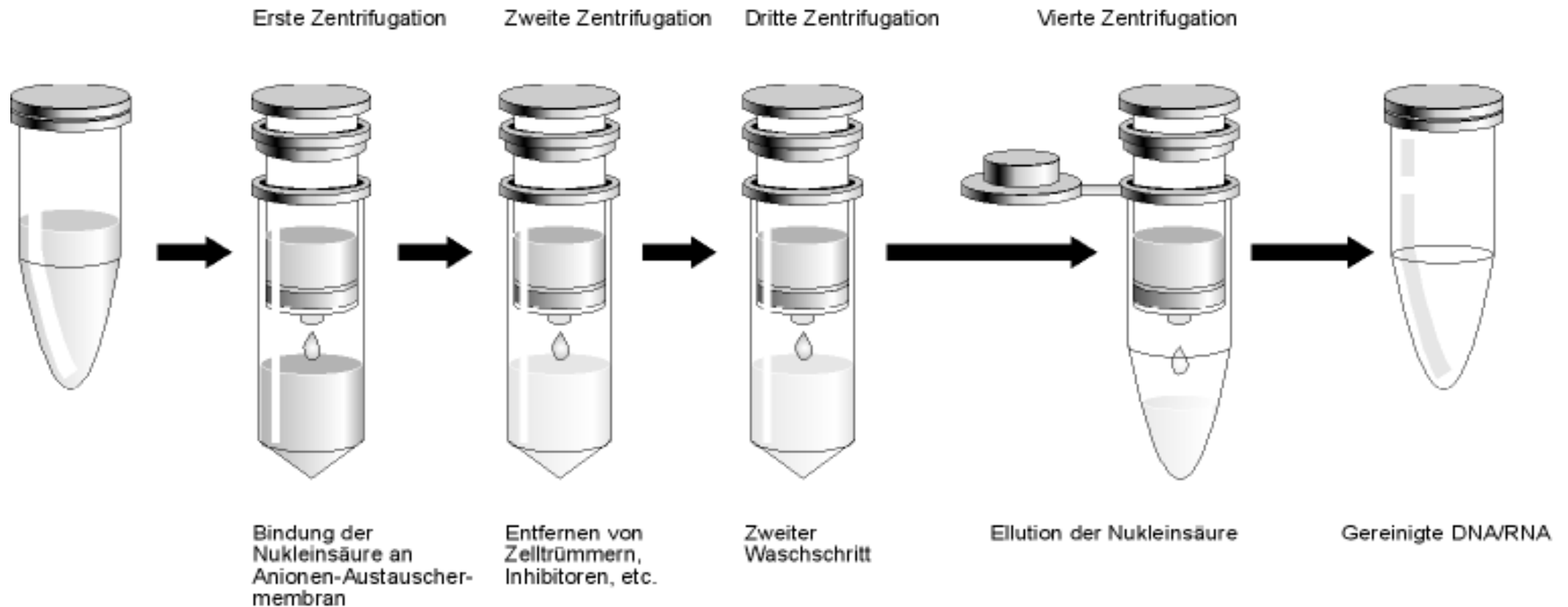
Bedingt geeignet

Getrocknetes Material
(Auflösung in PBS)

Nicht geeignet

Heparin-Blut

DNA-Isolation Säulensystem



Ausbeute: 200 μ l Blut: 4-12 μ g DNA

= ~ 20 ng/ μ l

DNA-Isolation magnetic-beads Verfahren

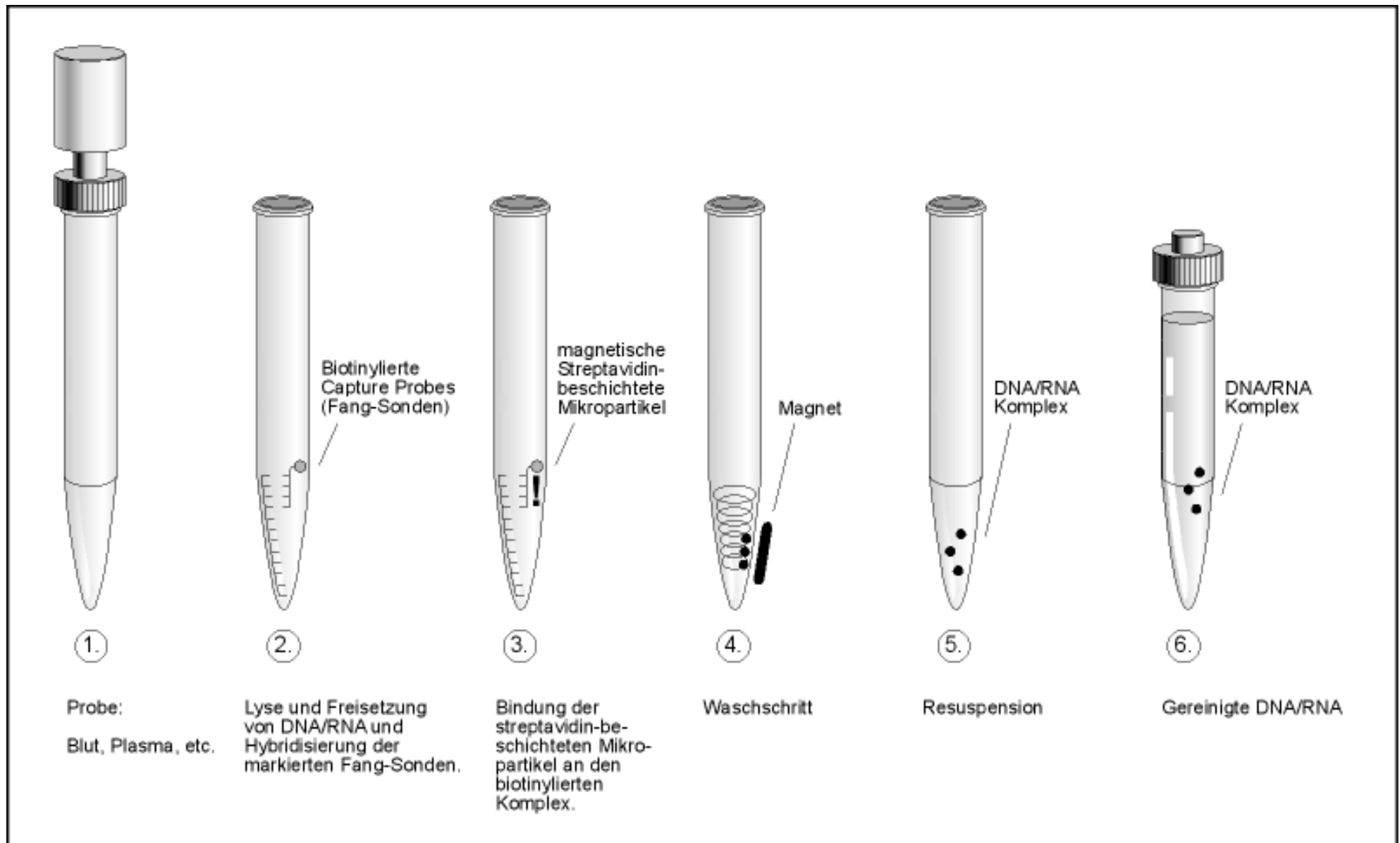


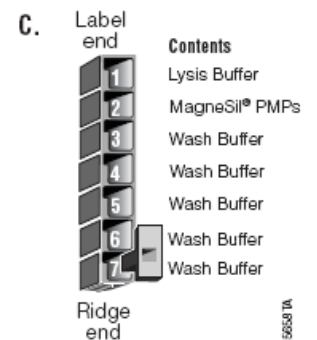
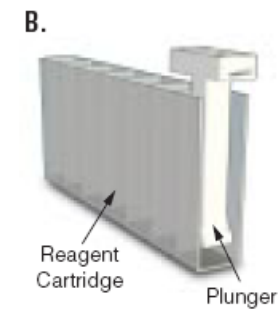
Abb. 1.3b: Beispiel für eine automatisierte Probenaufbereitung

Automatisierte DNA-Isolierung

Tecan 1



Maxwell 16



Das PCR-Labor

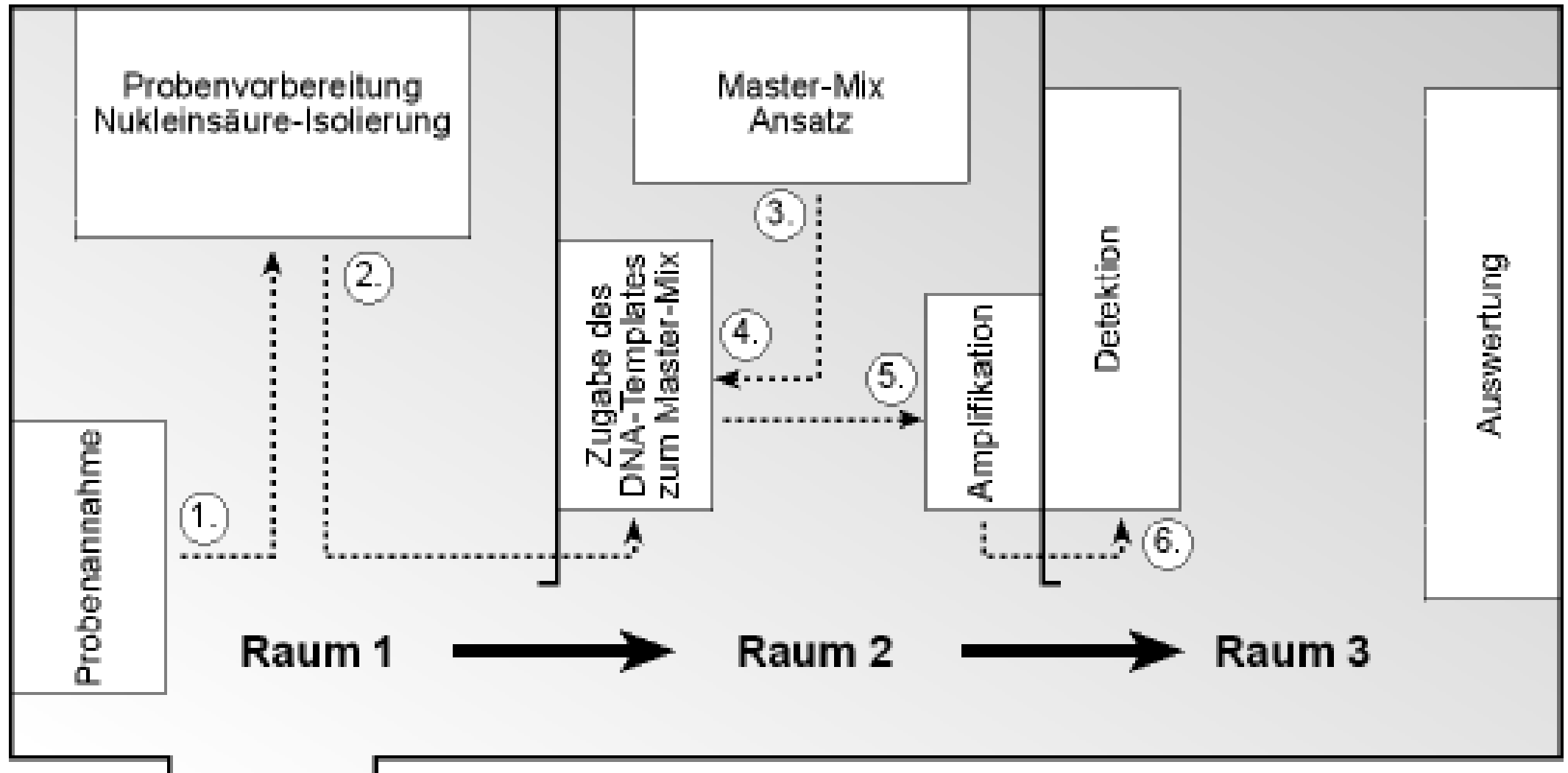
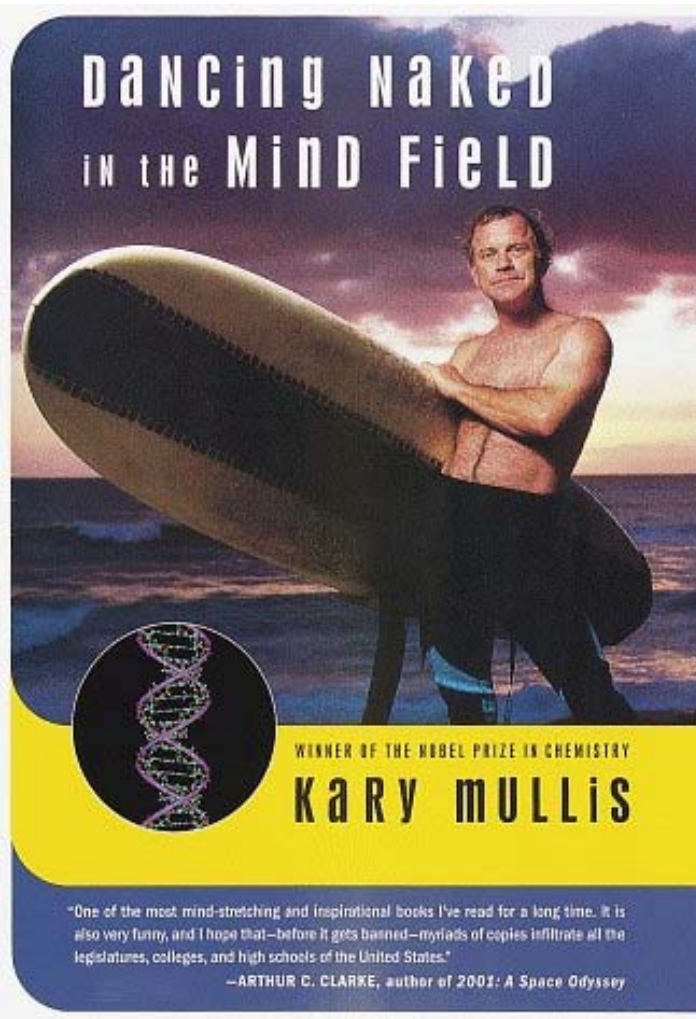


Abb. 1.2: PCR-Labor

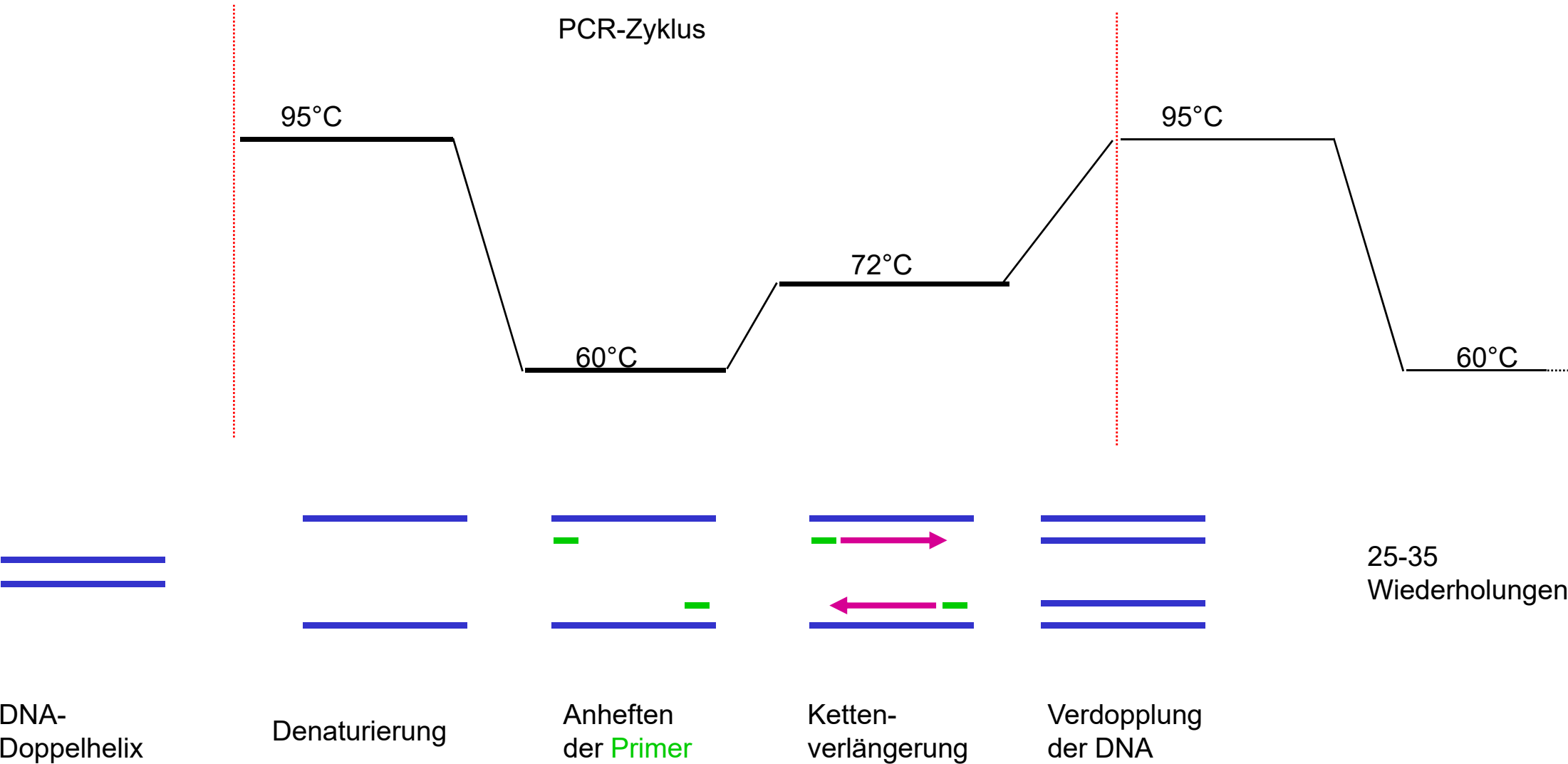
Die Polymerase-Ketten-Reaktion: Zugpferd der Molekularbiologie



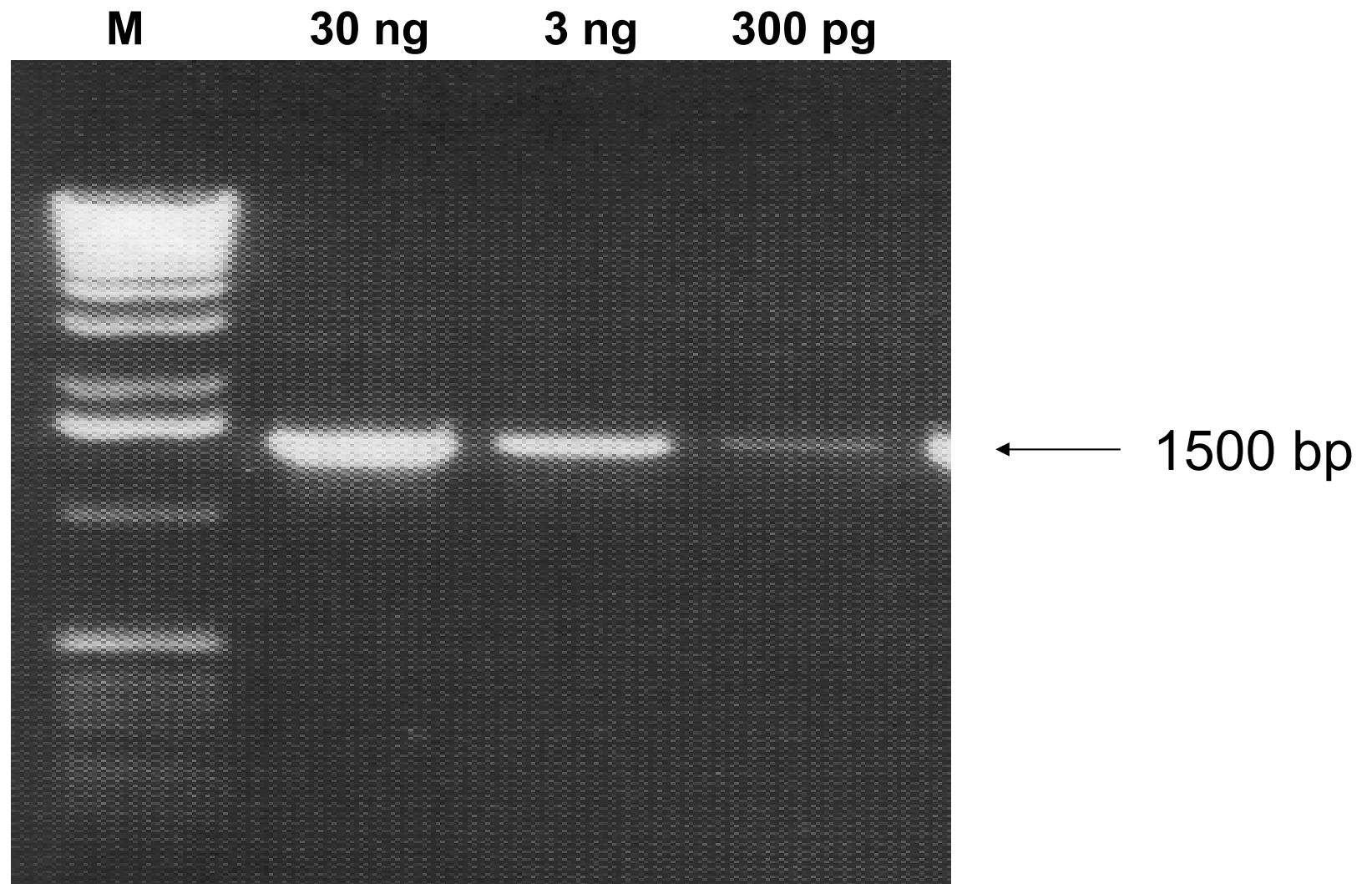
Nobelpreis
für Chemie
1993

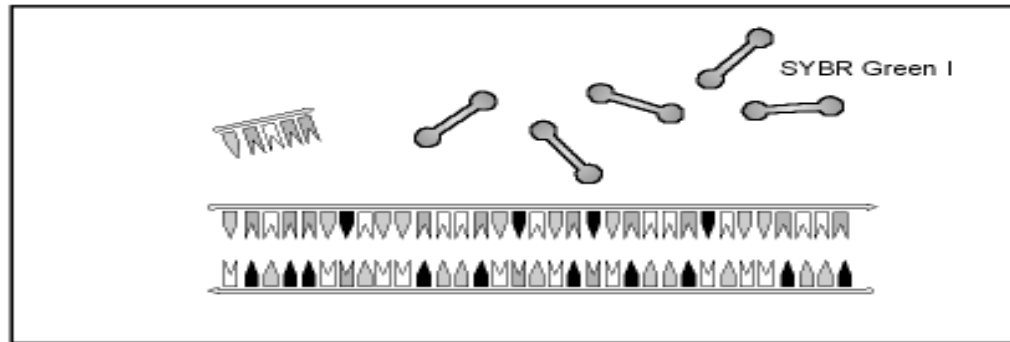
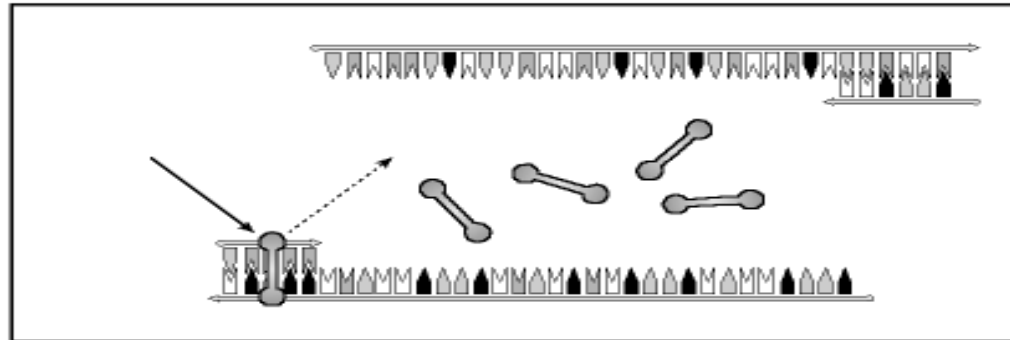
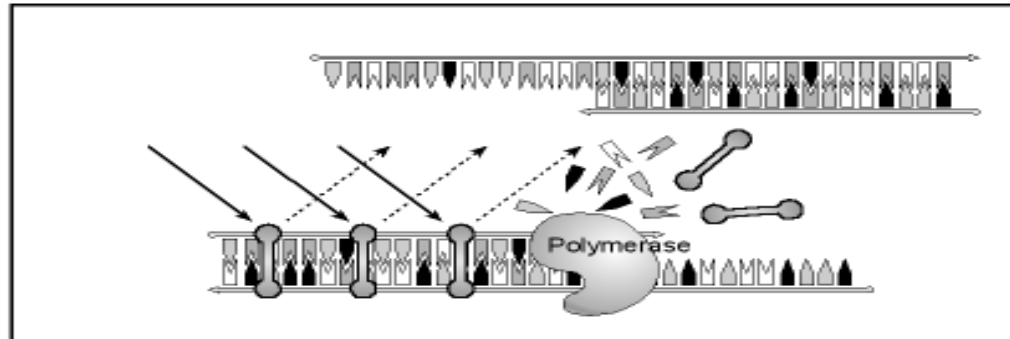
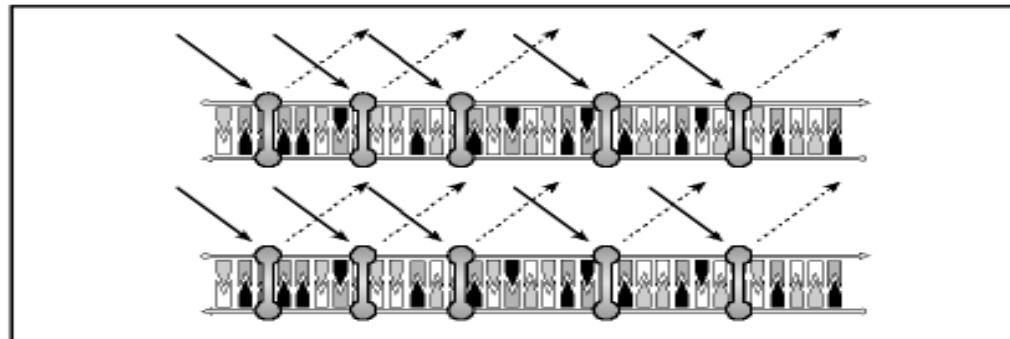


Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)



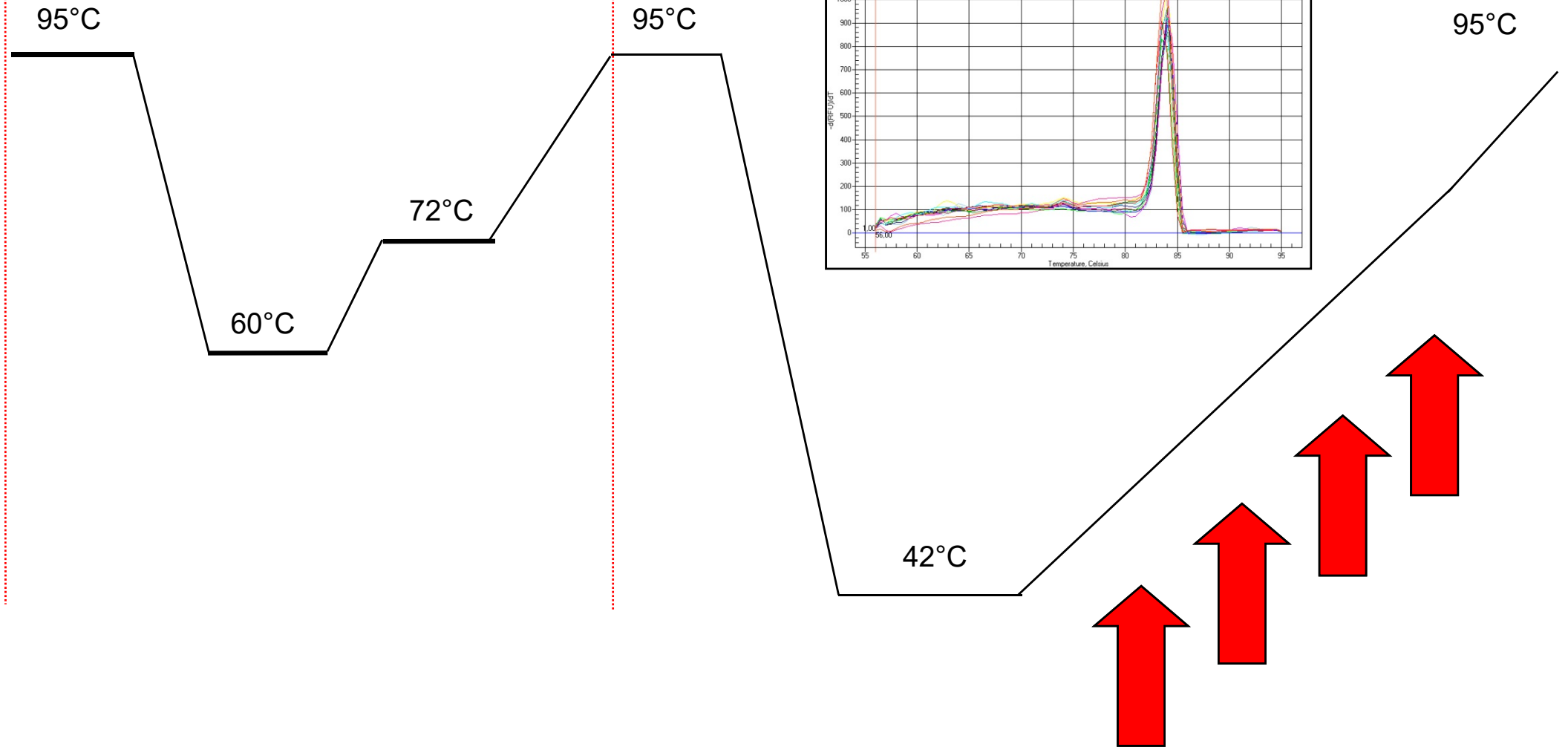
Agarose-Gelelektrophorese



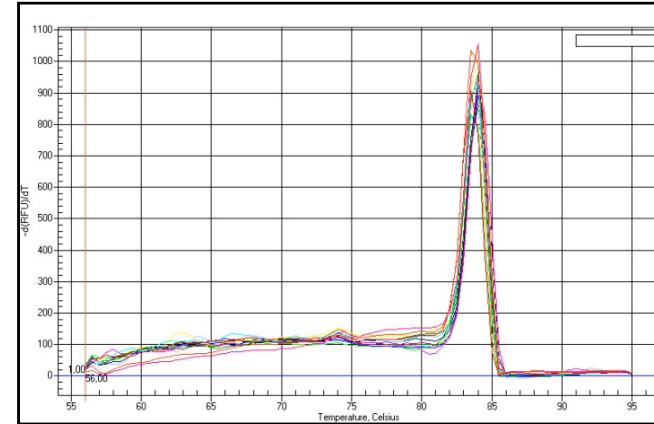
A**B****C****D**

Realtime-PCR mit SYBR Green

PCR-Zyklus (40x)



Schmelzkurven-Analyse



LightCycler: Mutationsanalyse

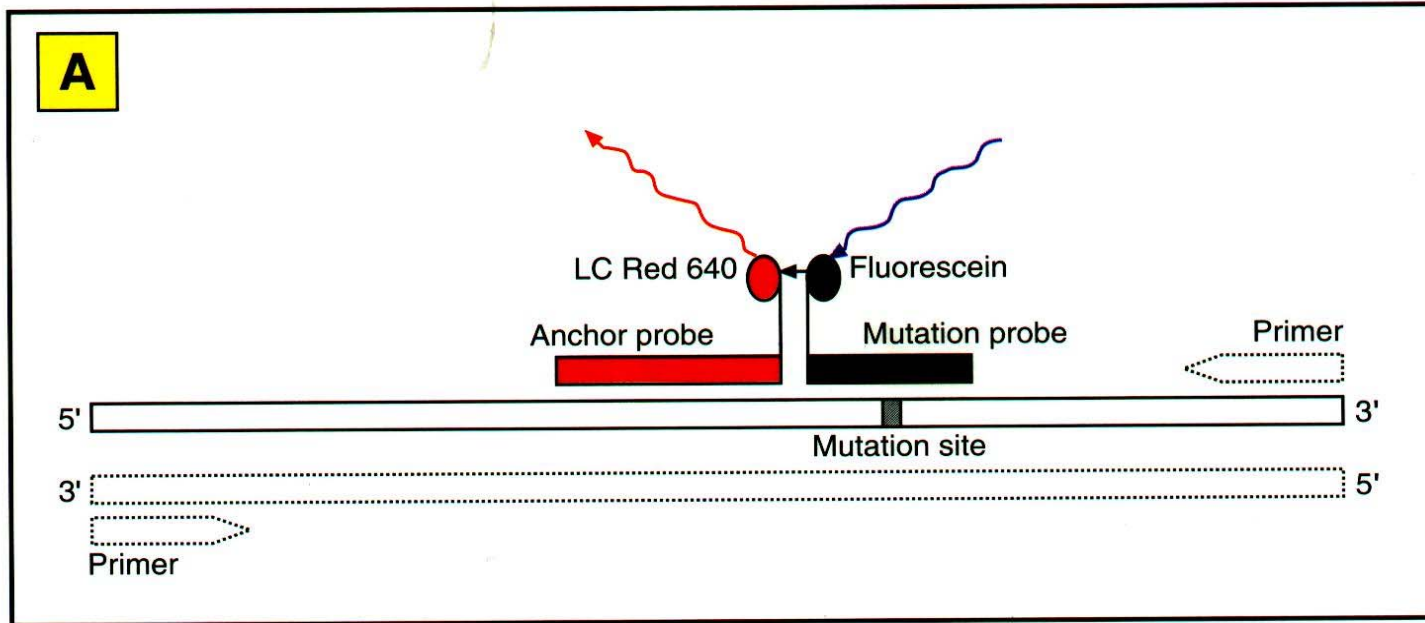
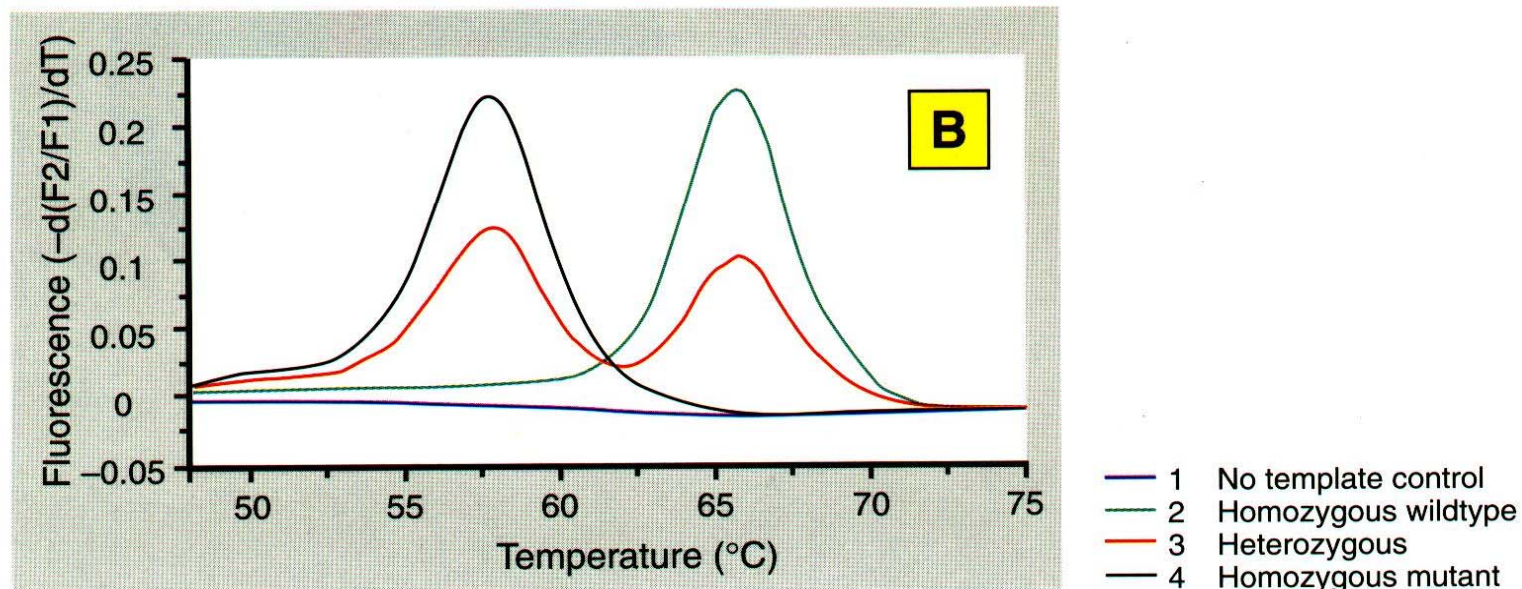


Figure 19. Single-color experiment to detect one-point mutation within the amplicon.

A. Schematic presentation of the Factor V PCR fragment. B. Melting curve analysis of different genotypes of the analyzed sequence.

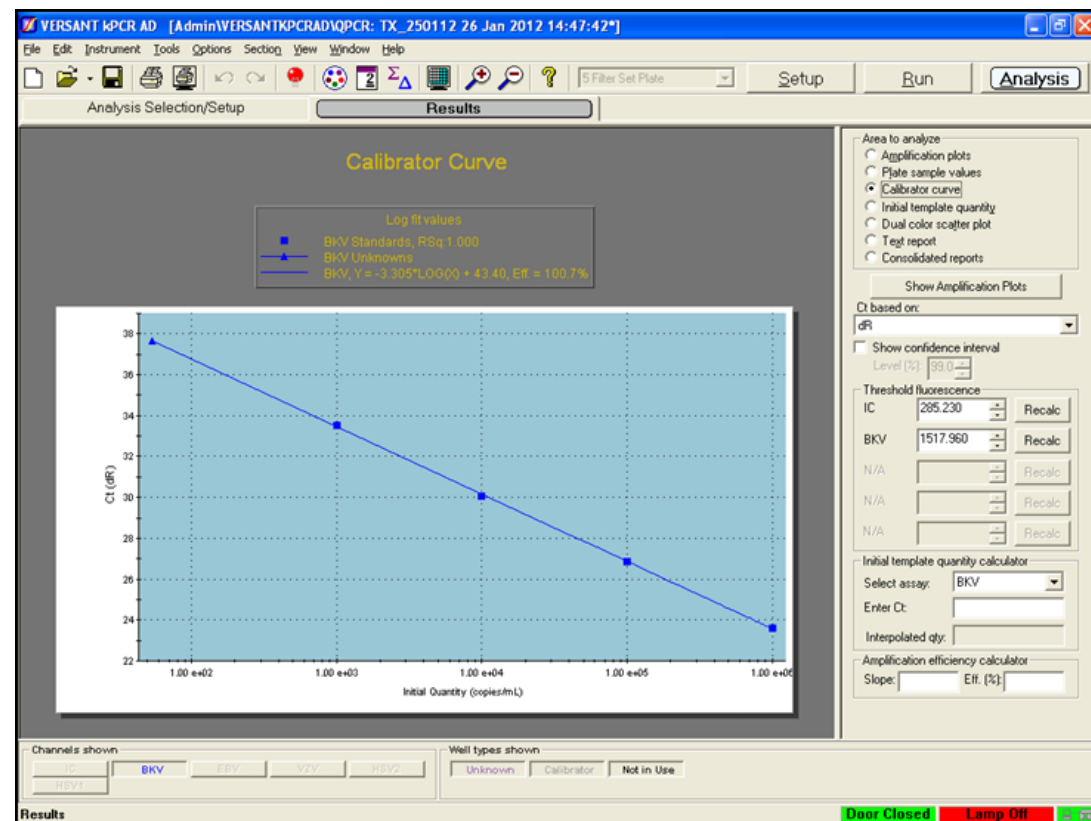
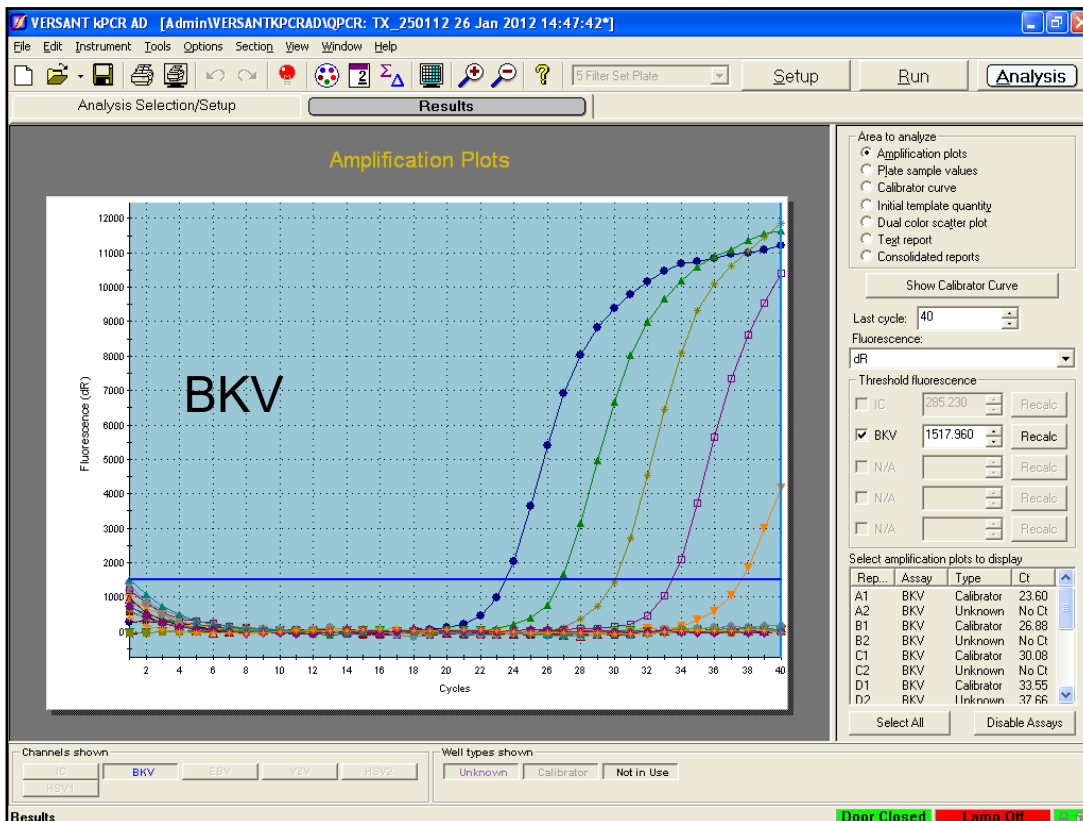


PCR und Realtime-PCR

Eine Vielzahl von Anwendungen

Infektionsdiagnostik (Viren, Pilze, Bakterien)

- Virusdiagnostik: HIV, HBV, HCV, BKV, EBV, CMV, HSV1+2, VZV
- Subtypen-Bestimmung – z.B. Influenza A/B „Schweinegrippe“
- In Kultur langsam wachsende Erreger (z.B. Chlamydien)



Vorgefertigte Kits

Gram (-) Bakterien	Gram (+) Bakterien	Pilze
■ Escherichia coli ■ Klebsiella (pneumoniae/ oxytoca) ■ Serratia marcescens ■ Enterobacter (cloacae/ aerogenes) ■ Proteus mirabilis ■ Pseudomonas aeruginosa ■ Acinetobacter baumannii ■ Stenotrophomonas maltophilia	■ Staphylococcus aureus ■ CoNS (Coagulase negative Staphylococci) ■ Streptococcus pneumoniae ■ Streptococcus spp ■ Enterococcus faecium ■ Enterococcus faecalis	■ Candida albicans ■ Candida tropicalis ■ Candida parapsilosis ■ Candida krusei ■ Candida glabrata ■ Aspergillus fumigatus

90 Keime in 6h aus 1,5 ml Blut

PCR eine Vielzahl von Anwendungen

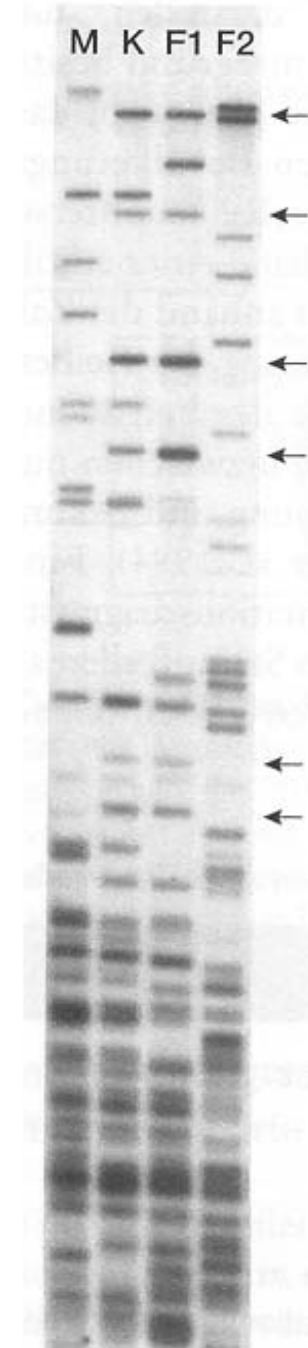
Genetischer Fingerabdruck

- 10-150 Bp lange, polymorphe, repetitive, tandemartige DNA-Sequenzen
- Short tandem repeats (STR), Unterscheidung naher Verwandte
- Lebensmittelüberwachung (z.B. Nachweis von Pferdefleisch)
- Vater- oder Mutterschaft

M= Mutter

K= Kind

F = Vater

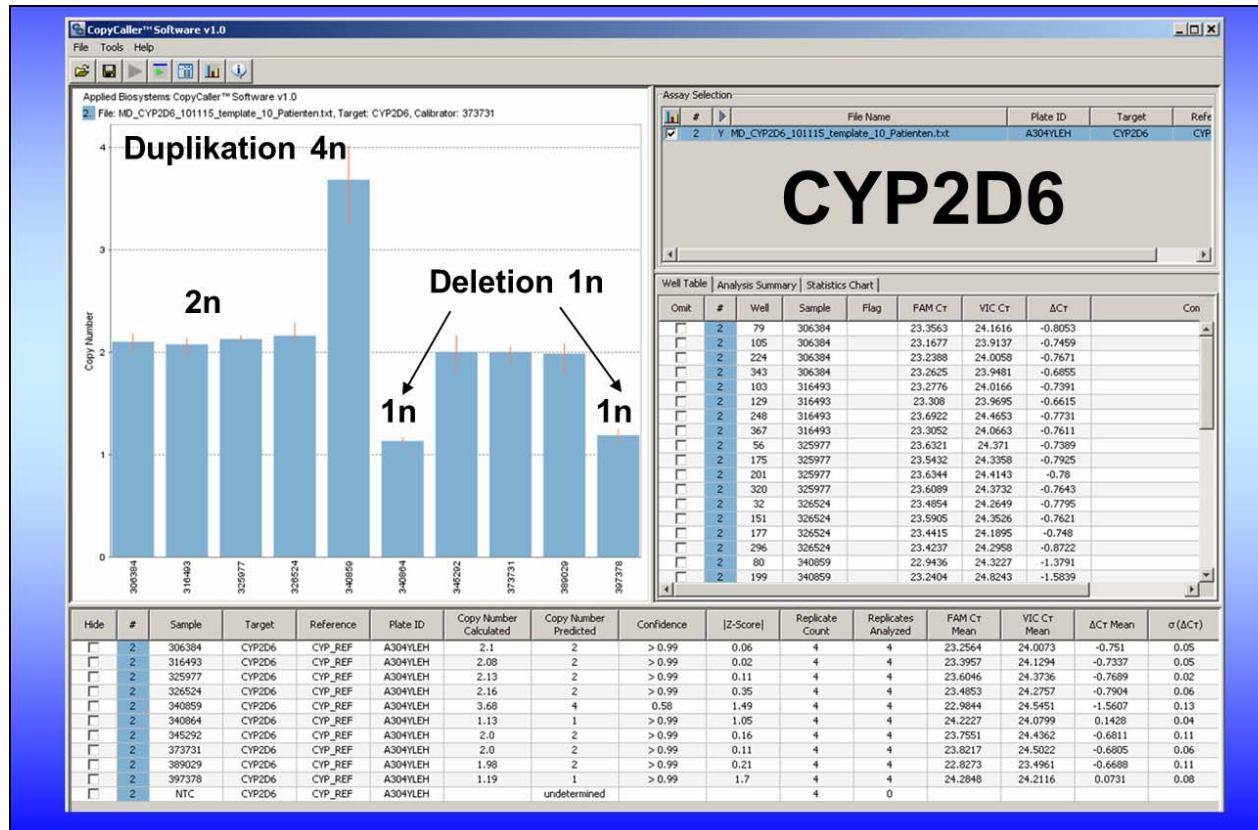


PCR und Realtime-PCR

Eine Vielzahl von Anwendungen

Genetische Störungen des Menschen

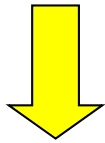
- Humangenetik (Erbkrankheiten)
- Tumorgenetik
- Immungenetik, HLA-Typisierung
- Prädispositionsdiagnostik (Thrombose-, KHK-Risiko)
- Pharmakogenetik



Absolute Quantifizierung, Ermittlung der Genkopienzahl

Geräte und Methoden in der Molekularen Diagnostik

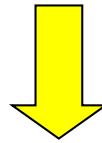
Sonden-spezifische
Echtzeit-PCR mit
Schmelzkurvenanalyse



LightCycler



Quantitative
Echtzeit-PCR
(5'-Nuclease-Assay)

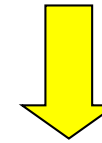


TaqMan
ABI Prism 7900

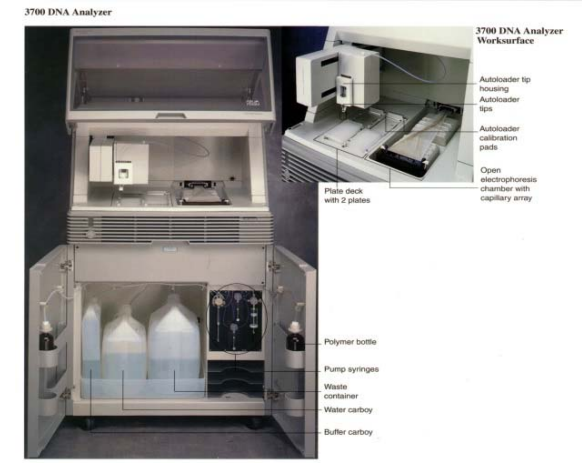


A high-perform.

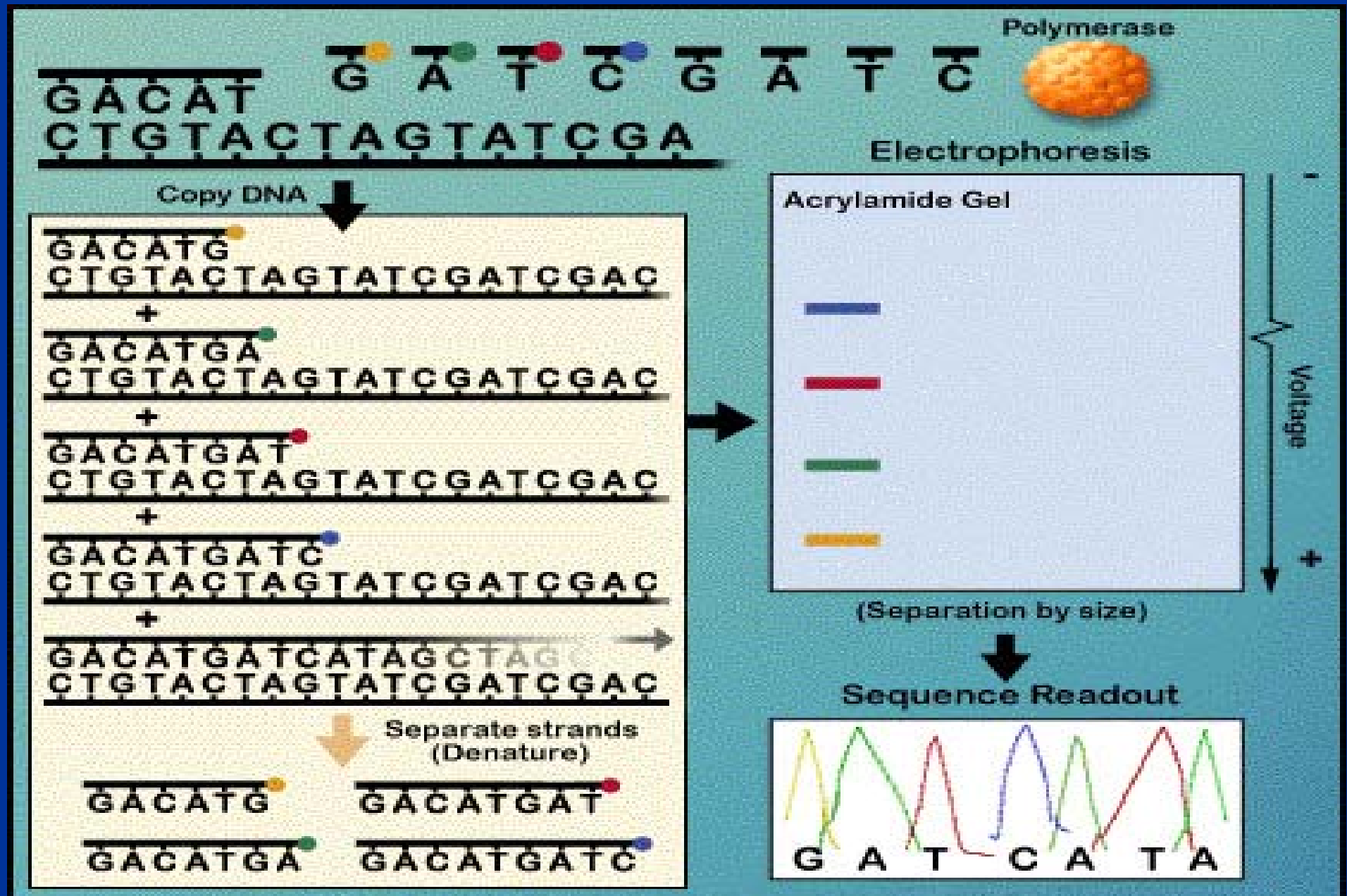
DNA-Sequenzierung



Kapillarsequenzierer
ABI Prism 3700



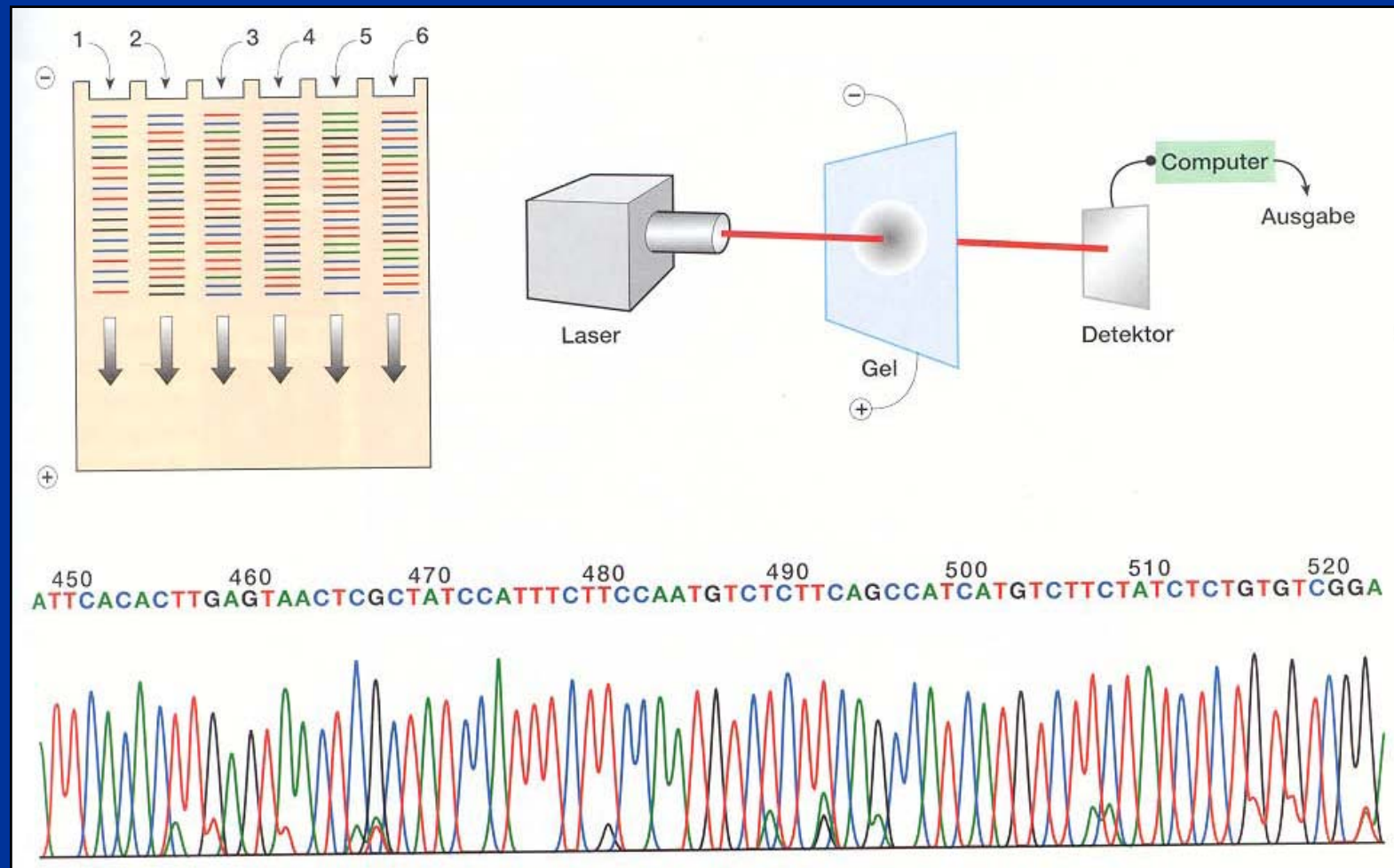
Prinzip der Sequenzierung nach dem Kettenabbruchprinzip nach Sanger



DNA-Sequenzierung

Kapillarelektrophorese + Bioinformatik: Heute Goldstandard

- Hohe Zuverlässigkeit
- Lange Sequenzabfolgen lesbar
- Automatisierbar



Familiäres Mittelmeerfieber und andere vererbliche periodische Fiebersyndrome

Molekulargenetische Differenzialdiagnose seit März 2016 im Zentrallabor etabliert

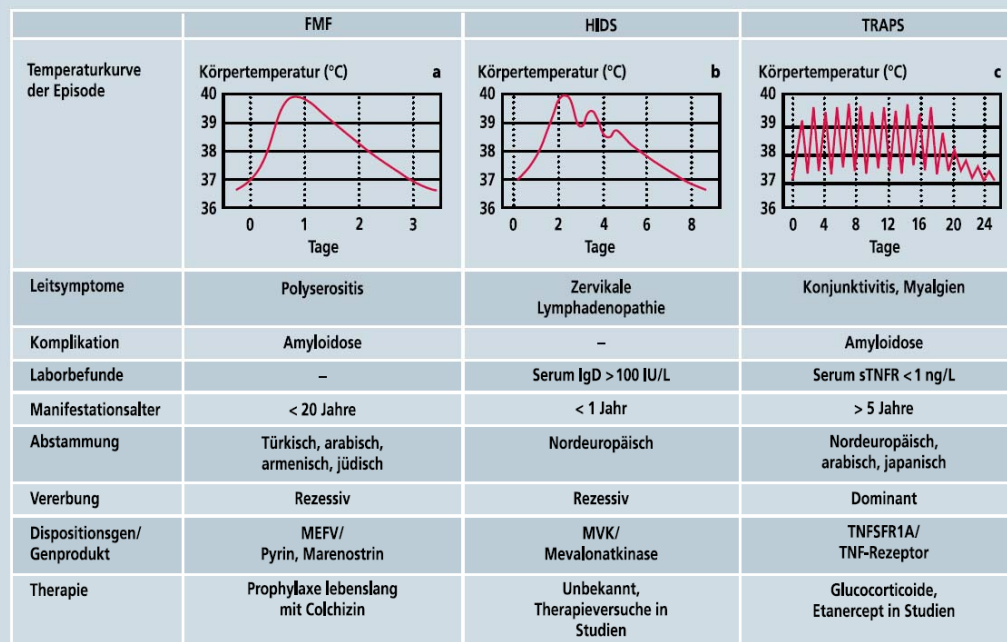
-Die Symptome sind:

Hohes periodisch auftretendes Fieber, Erytheme, u.a. auch Bauch- und/oder Thoraxschmerzen

-Die Therapie ist häufig abhängig von dem betroffenen Gen bzw. der Erkrankung

-Spätfolgen: z.B. Amyloidose

Grafik 1



Vergleich typischer Merkmale des familiären Mittelmeerfiebers (FMF), des Hyper-IgD-Syndroms (HIDS) und des Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziierten periodischen Syndroms (TRAPS) (modifiziert nach 23)



FMF



TRAPS



HIDS



MWS/FCAS

FMF: Familiäres Mittelmeerfieber

TRAPS: TNF Rezeptor-assoziiertes Syndrom

HIDS: Hyper-IgD Syndrom

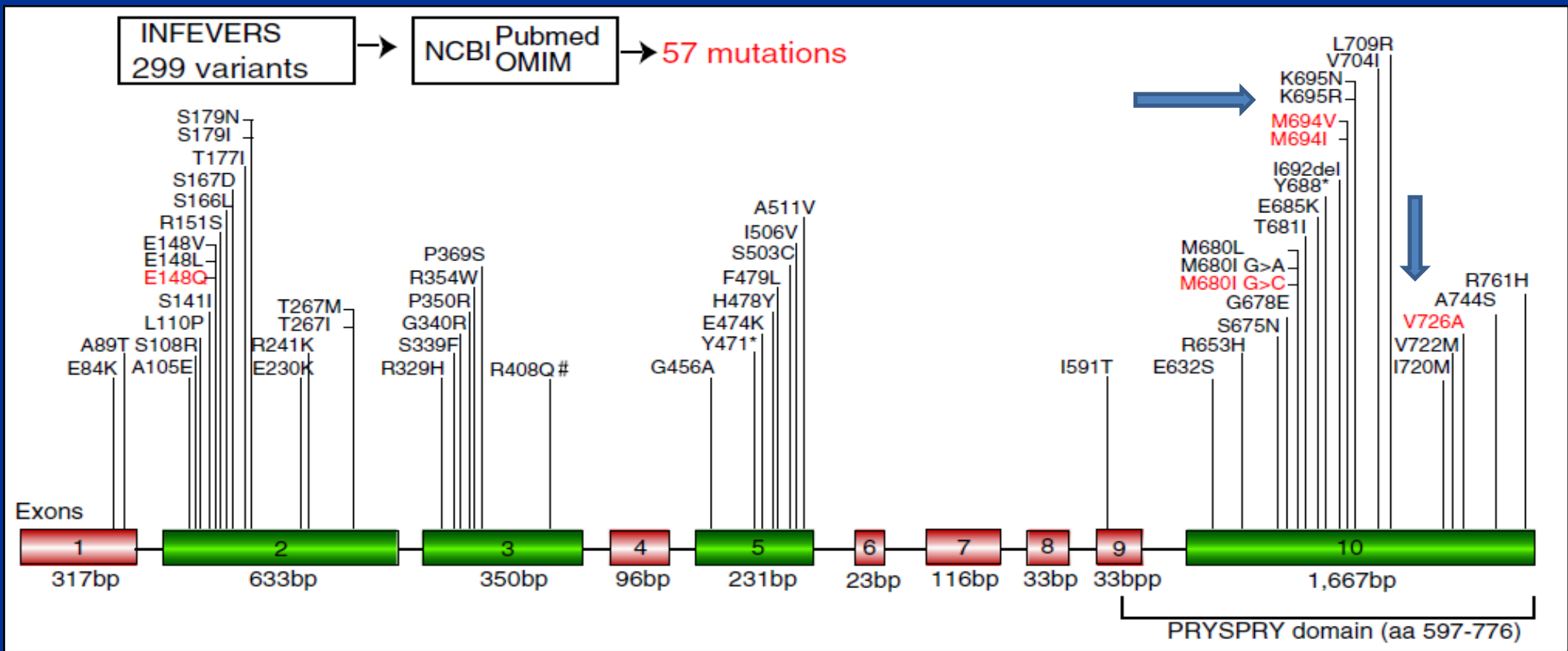
Cryopyrin-assoziierten Periodische Syndrome

MWS/FCAS:

Muckle-Wells-Syndrom

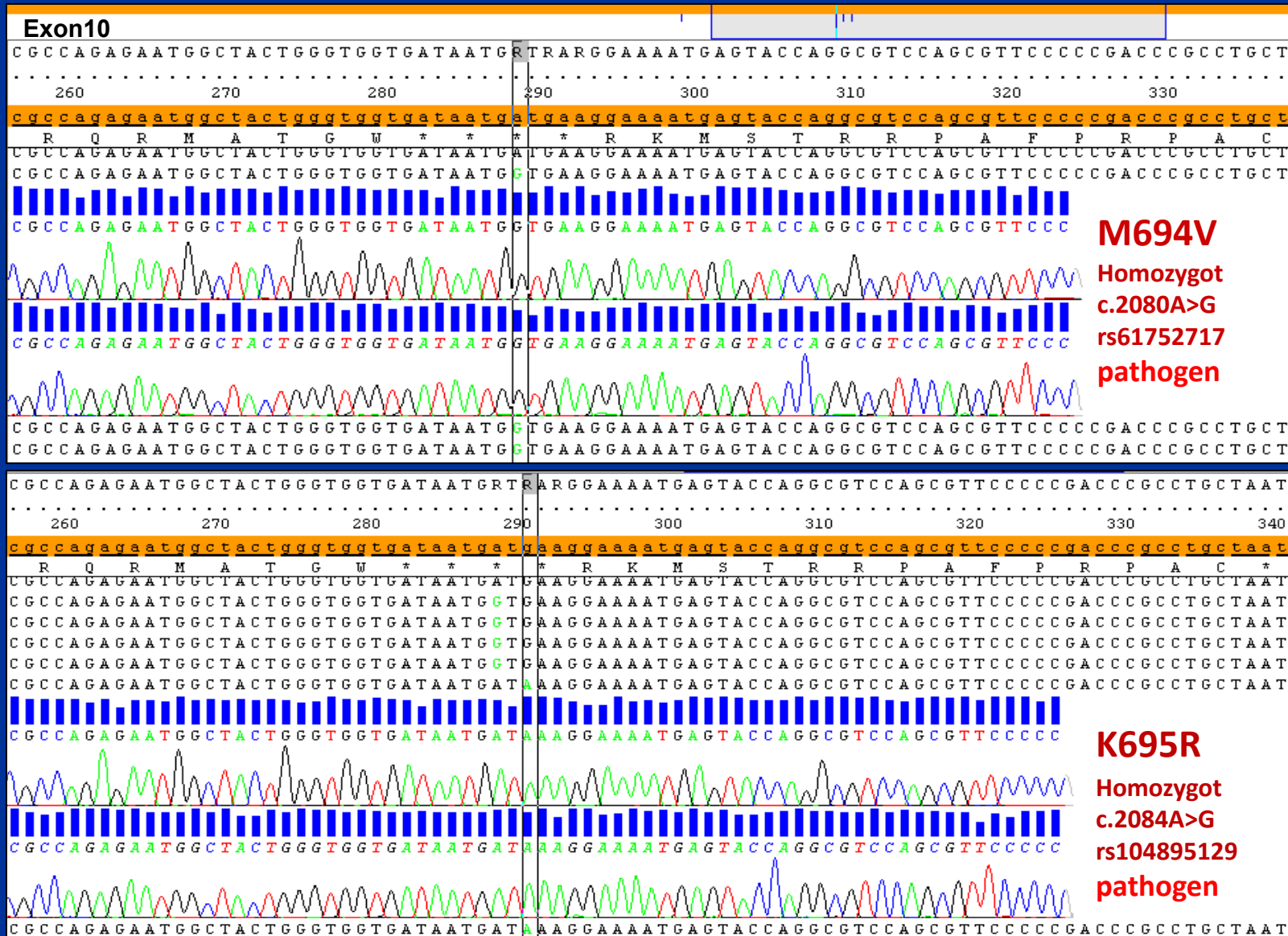
Familiäres Kälte-assoziiertes Syndrom

Familiäres Mittelmeerfieber, genetische Varianten (SNPs) und Mutationen im MEFV-Gen



Mutationsnachweis im MEFV-Gen mittels Sanger Sequenzierung

Erbgang: autosomal rezessiv



Ältere Sequenzierer verschiedener Hersteller

Sanger sequencing (100 Mb/day)

Next generation sequencing (Gb's/day)

ABI 3730 XL

454 (GS-FLX)

Illumina (GA)

ABI (Solid)



Termination by ddNTPs



Pyrosequencing



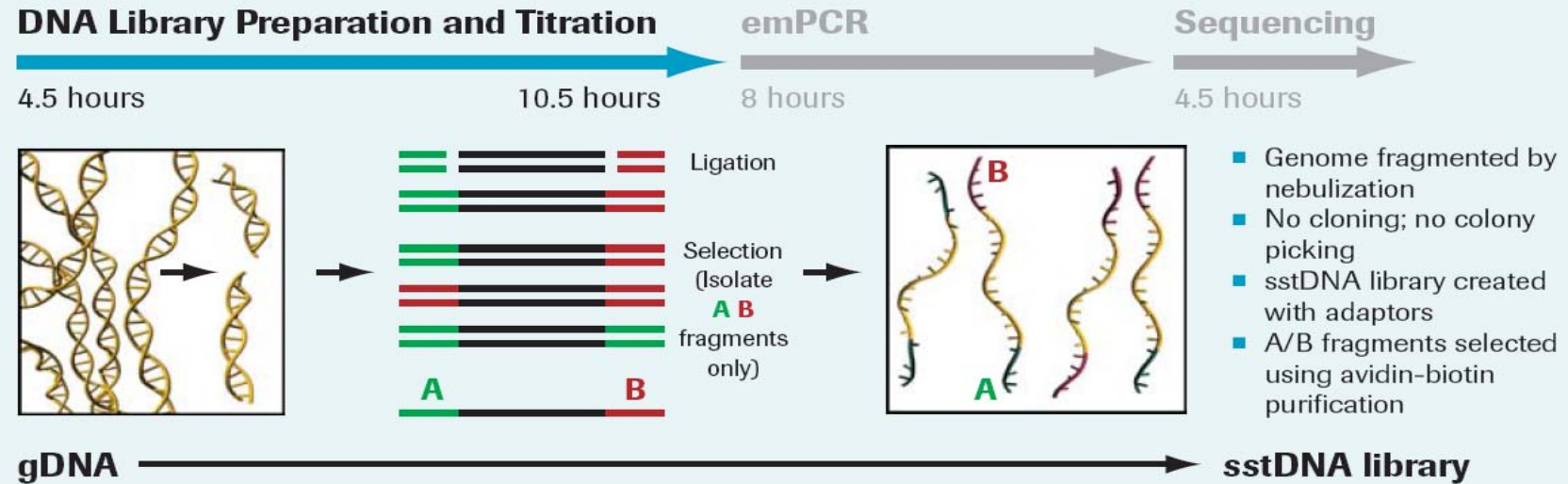
Reversible termination
sequencing



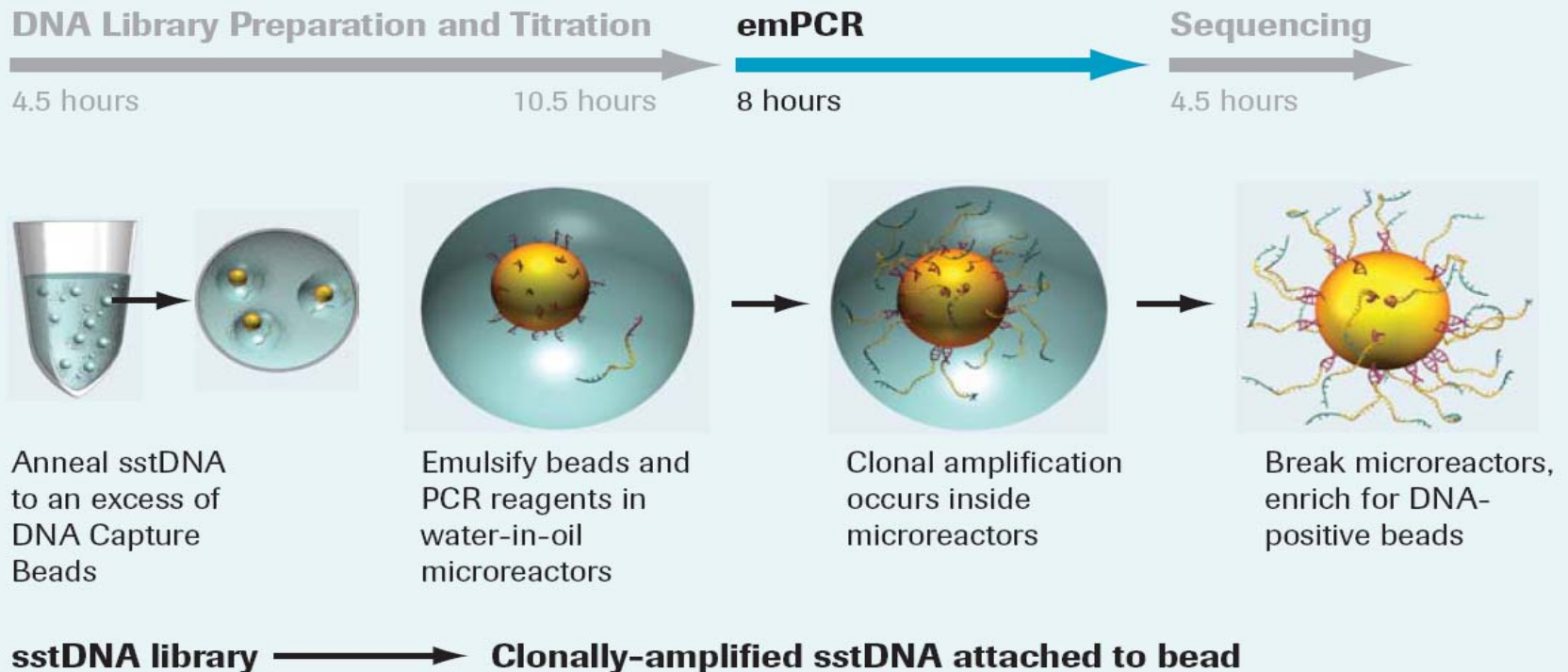
Sequencing
by ligation

Genomsequenzierung mit dem 454

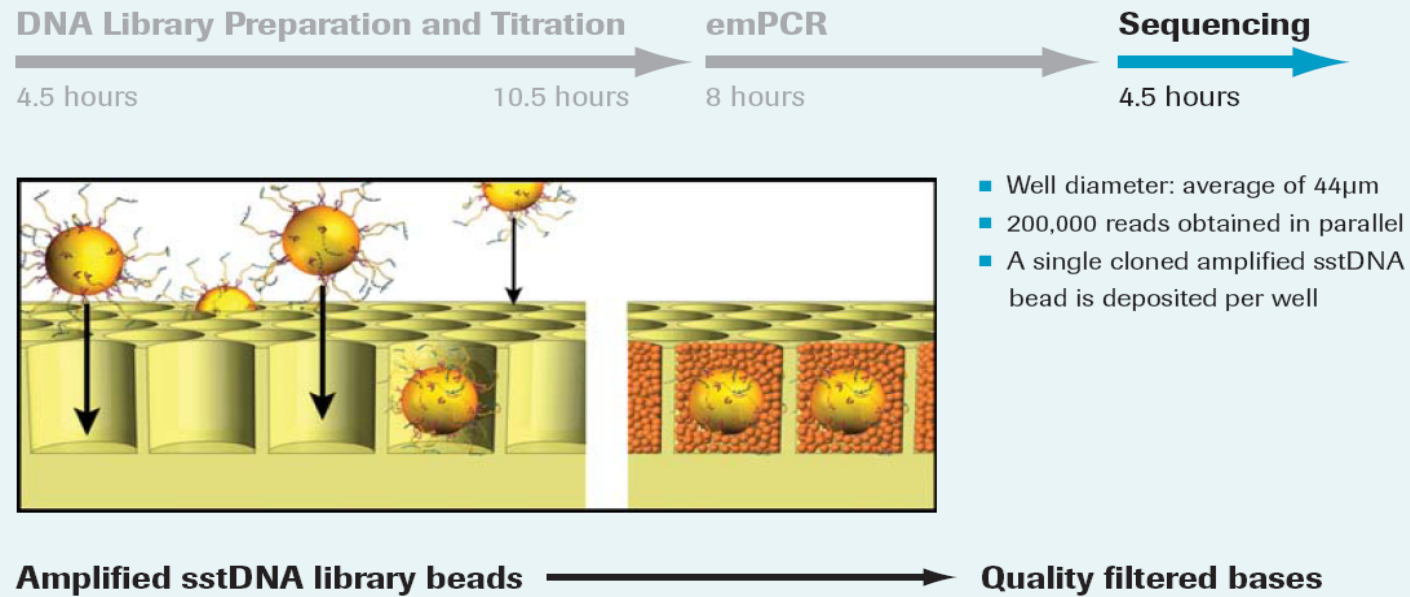
1. Schritt



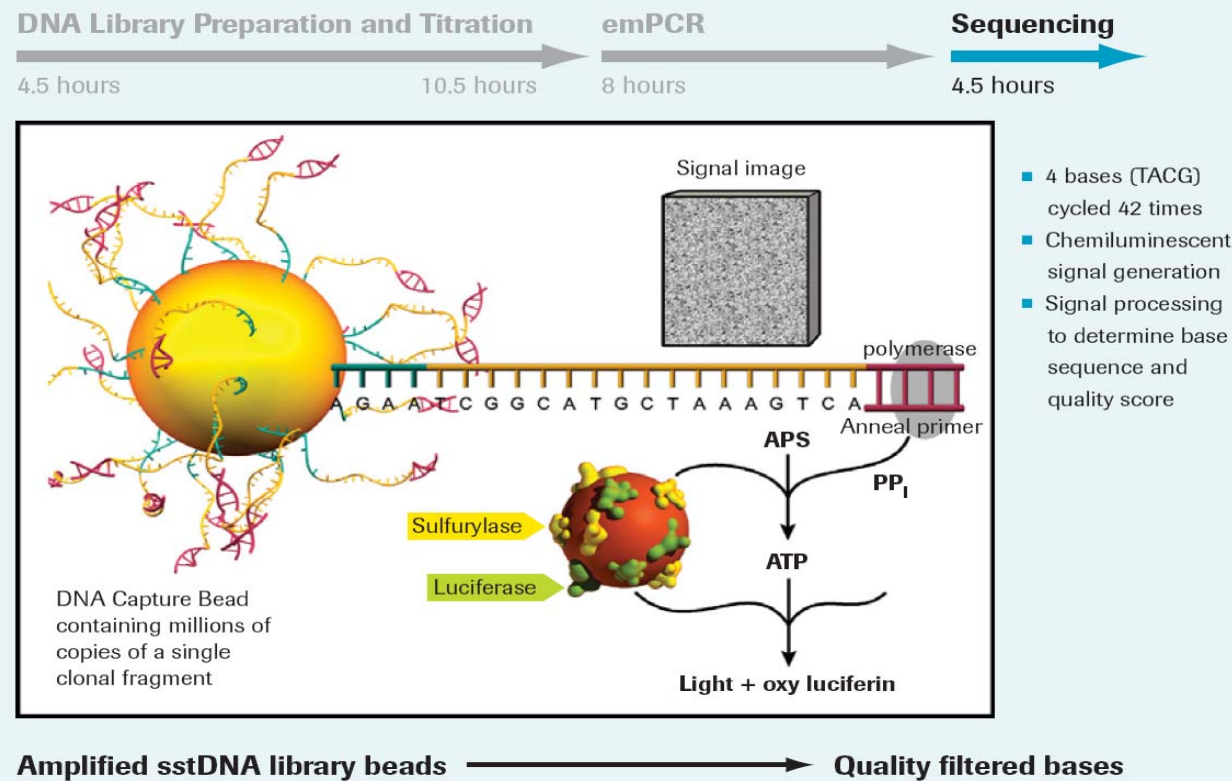
2. Schritt

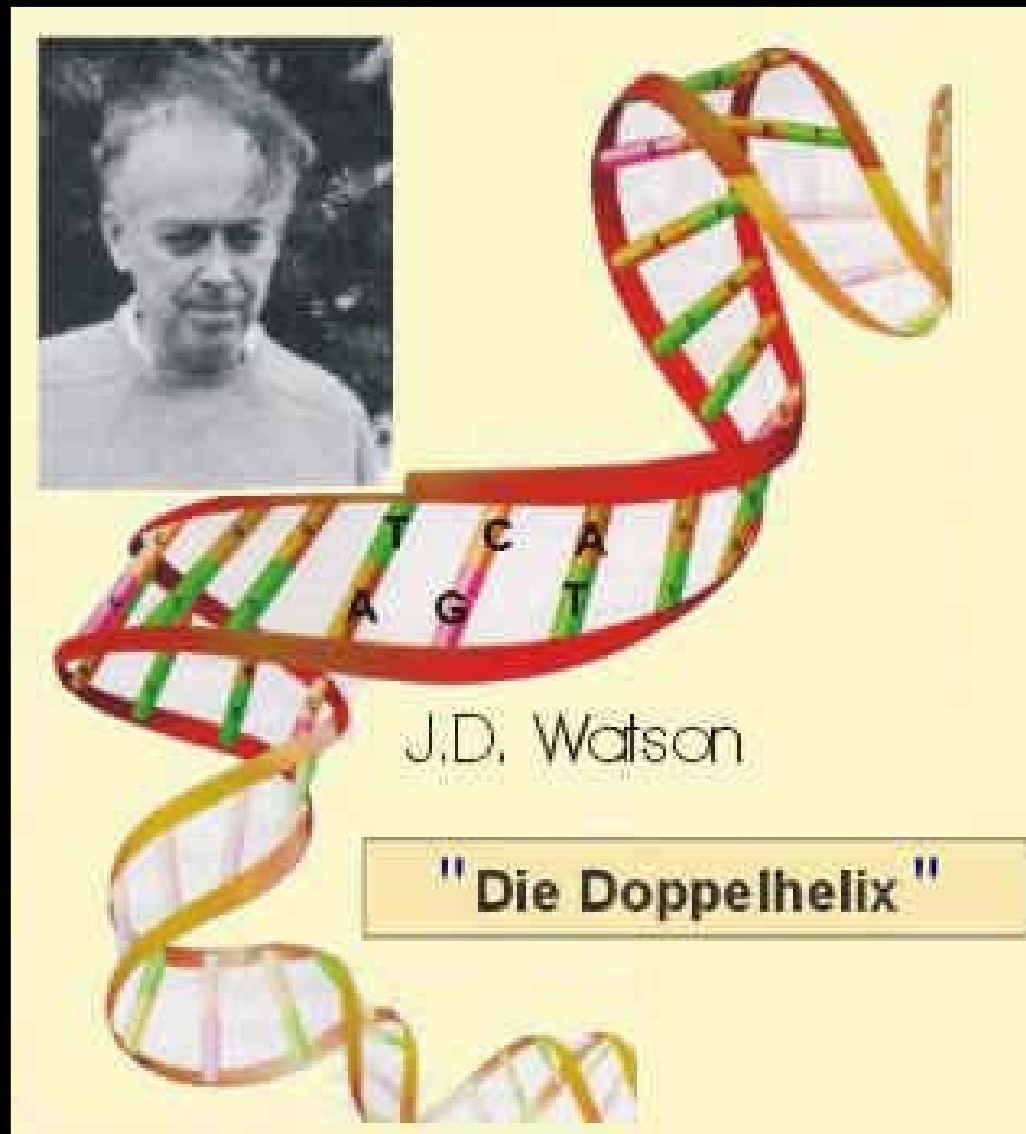


3. Schritt



4. Schritt





- 2 Monate für die Analyse des Watson Genoms
- 2014 Start des 100.000 x humane Genomprojekt:
The Prime Minister (UK) has pledged that the UK will map 100,000 human genomes by 2017. Veranschlagte Investitionskosten: 300.000.000 £

Next, Next Generation Sequencing, Stand Oktober 2014

Sequencing systems for every lab, application, and scale of study.

From the power of the [HiSeq X](#) to the speed of [MiSeq](#), Illumina has the sequencer that's just right for you.



MiSeq
Focused power. Speed and simplicity for targeted and small genome sequencing.



NextSeq 500
Flexible power. Speed and simplicity for everyday genomics.



HiSeq 2500
Production power. Power and efficiency for large-scale genomics.



HiSeq X*
Population power. \$1,000 human genome and extreme throughput for population-scale sequencing.

Key applications	Small genome, amplicon, and targeted gene panel sequencing.	Everyday genome, exome, transcriptome sequencing, and more.		Production-scale genome, exome, transcriptome sequencing, and more.		Population-scale human whole-genome sequencing.
Run mode	N/A	Mid-Output	High-Output	Rapid Run	High-Output	N/A
Flow cells processed per run	1	1	1	1 or 2	1 or 2	1 or 2
Output range	0.3-15 Gb	20-39 Gb	30-120 Gb	10-300 Gb	50-1000 Gb	1.6-1.8 Tb
Run time	5-55 hours	15-26 hours	12-30 hours	7-60 hours	< 1 day - 6 days	< 3 days
Reads per flow cell†	25 Million‡	130 Million	400 Million	300 Million	2 Billion	3 Billion
Maximum read length	2 × 300 bp	2 × 150 bp	2 × 150 bp	2 × 250 bp	2 × 125 bp	2 × 150 bp

Genpanel

Exom

Exom + Genom

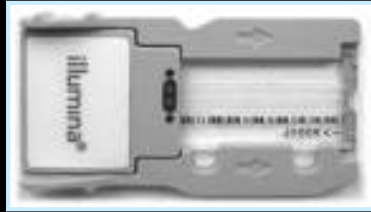
Genom + „Populationsgenome“

NGS in der Routine Diagnostik im CfL seit März 2015 möglich

Beschluss vom 11. März 2016:

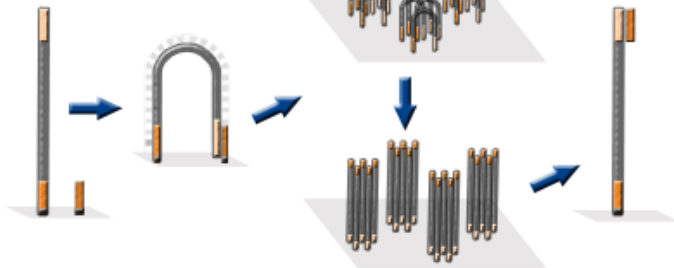
Im Einheitlichen Bewertungsmaßstab (EBM) der Gebührenordnung wird zum 01. Juli 2016 die Abrechenbarkeit von NGS ermöglicht

Flow Cell
MiSeq

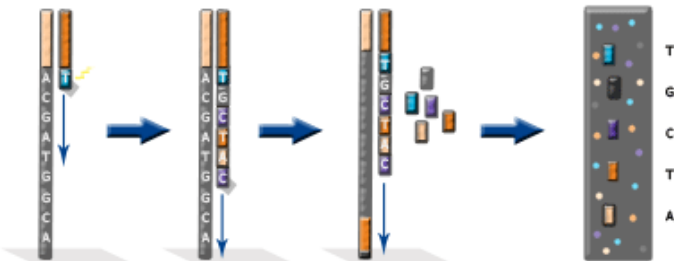


Bridged PCR + NGS

1. Attach DNA to flow cell
2. Perform bridge amplification
3. Generate clusters
4. Anneal sequencing primer



5. Extend first base, read, and deblock
6. Repeat step above to extend strand
7. Generate base calls



Anwendungen der NGS-Methodik in der molekularen Routinediagnostik

1. „Long Range PCR“ bis ca. 80 KB

Allelspezifische HLA Typisierung mehrerer Patienten in einer Analyse (max. 384 Patienten)

2. Analyse von Virus- und Bakteriengenomen:

Hygiene Nachweis von resistenten Krankenhauskeimen aus vielen verschiedenen Proben

HIV-Genotypisierung „Deep Sequencing“ frühe Erkennung neuer resistenter Stämme

3. Paneldiagnostik

Neurogenetik: 12 Patienten x 200 Gene pro Run (MiSeq)

Humangenetik: 40 Gene des hereditären Mammakarzinoms

Molekularpathologie: „Cancer Panel“ therapierelevante Gene

4. Exomsequenzierung

Humangenetik: Mutationsanalyse bei unbekannter Verdachtsdiagnose

5. Genomsequenzierung

Humangenetik: Mutationsanalyse bei unbekannter Verdachtsdiagnose

Exom: ca. 1% des Genoms – umfasst alle kodierende Genabschnitte

Deepsequencing: Nachweis von Mutationen und genetischen Varianten in wenigen Zellen oder Zellpopulationen

Auswertung und Befunderstellung mit Hilfe von:

- Datenbanken (NCBI, HGMD, Infevers)
- Vorhersageprogrammen (Mutation Taster, Polyphen 2)
- Einschlägiger Fachliteratur

Klassifikation der nachgewiesenen Sequenzvarianten

nach RICHARDS et al (2015) ACMG Standards and Guidelines, Interpretation of sequence variants

1. Nicht pathogen oder keine klinische Signifikanz

SNPs ohne Effekt auf die Funktionalität des Proteins

2. Wahrscheinlich nicht pathogen oder von geringer klinischer Signifikanz

SNP oder häufige Mutation mit Aminosäureaustausch mit fraglicher Auswirkung auf die Funktionalität

3. Mutationen unklarer klinischer Signifikanz

Mutationen mit geringer Auswirkung auf die Funktionalität , häufig „Low Penetrance Mutationen“

4. Mutationsnachweis mit hoher klinischer Signifikanz

wahrscheinlich für die Erkrankung ursächliche Mutation/en mit Veränderung der Funktionalität des Proteins

5. Mutationsnachweis mit klarer klinischer Signifikanz

ursächliche Mutation/en, mit starker Auswirkung auf die Funktion oder Funktionsverlust des Proteins

- Wildtyp: negativ (Kategorie 1 wird in der Regel zum Wildtyp gerechnet)
- Fraglich: Kategorie 2 und 3
- Positiv: Kategorie 4 und 5

Single Nucleotide Polymorphism (SNP): MAF > 1%, Mutation: MAF < 1%

Alle Menschen sind eng miteinander verwandt



Unterschied zwischen
diesen beiden
Personen < 1 von 1.000
Basen

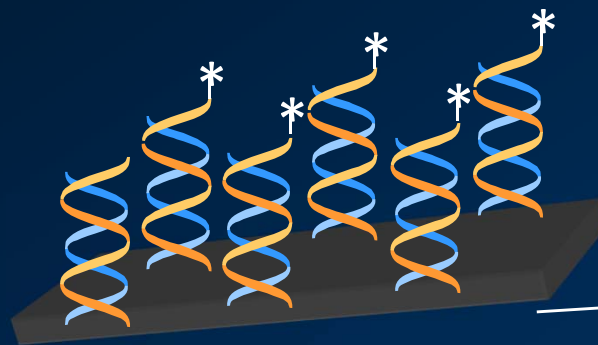
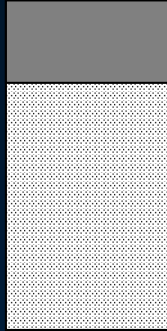


Das menschliche Genom (3,2 GBasen) hat:

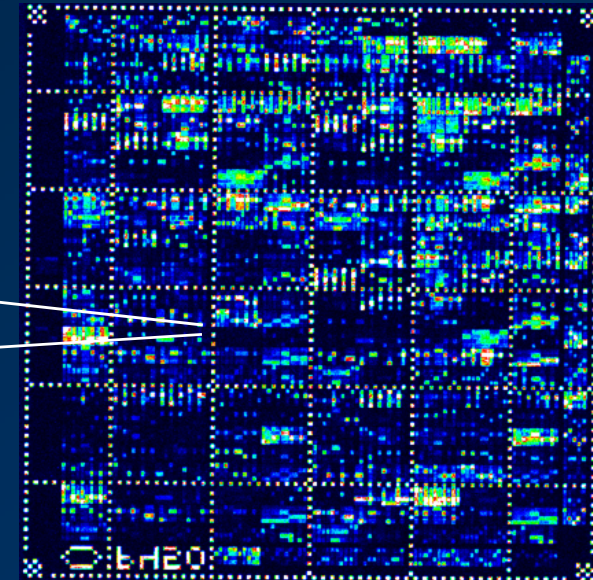
- ca. 38 Millionen Einzelpolymorphismen (SNPs)
- ca. 1,4 Millionen kurze Insertionen und Deletionen sowie 14.000 größere Deletionen
- ca. 90% der genetischen Unterschiede zwischen Menschen werden durch ca. 60,000 SNPs in kodierenden Regionen verursacht



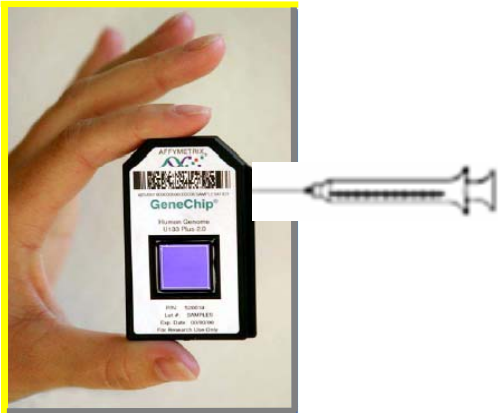
Was ist ein Gen-Chip?



20 μm



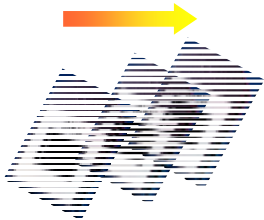
GeneChip® Process Flow



Hybridization Oven 640



Hybridize
(16-18 hours)



Wash
&
Stain

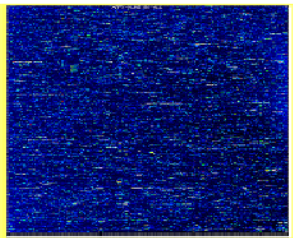


Scanner 3000



Data Analysis I
and
Quality Control

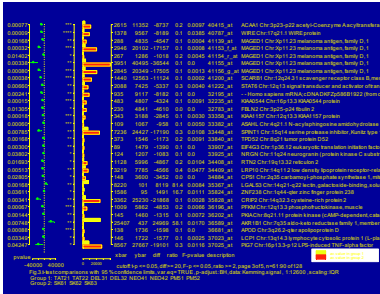
Scan



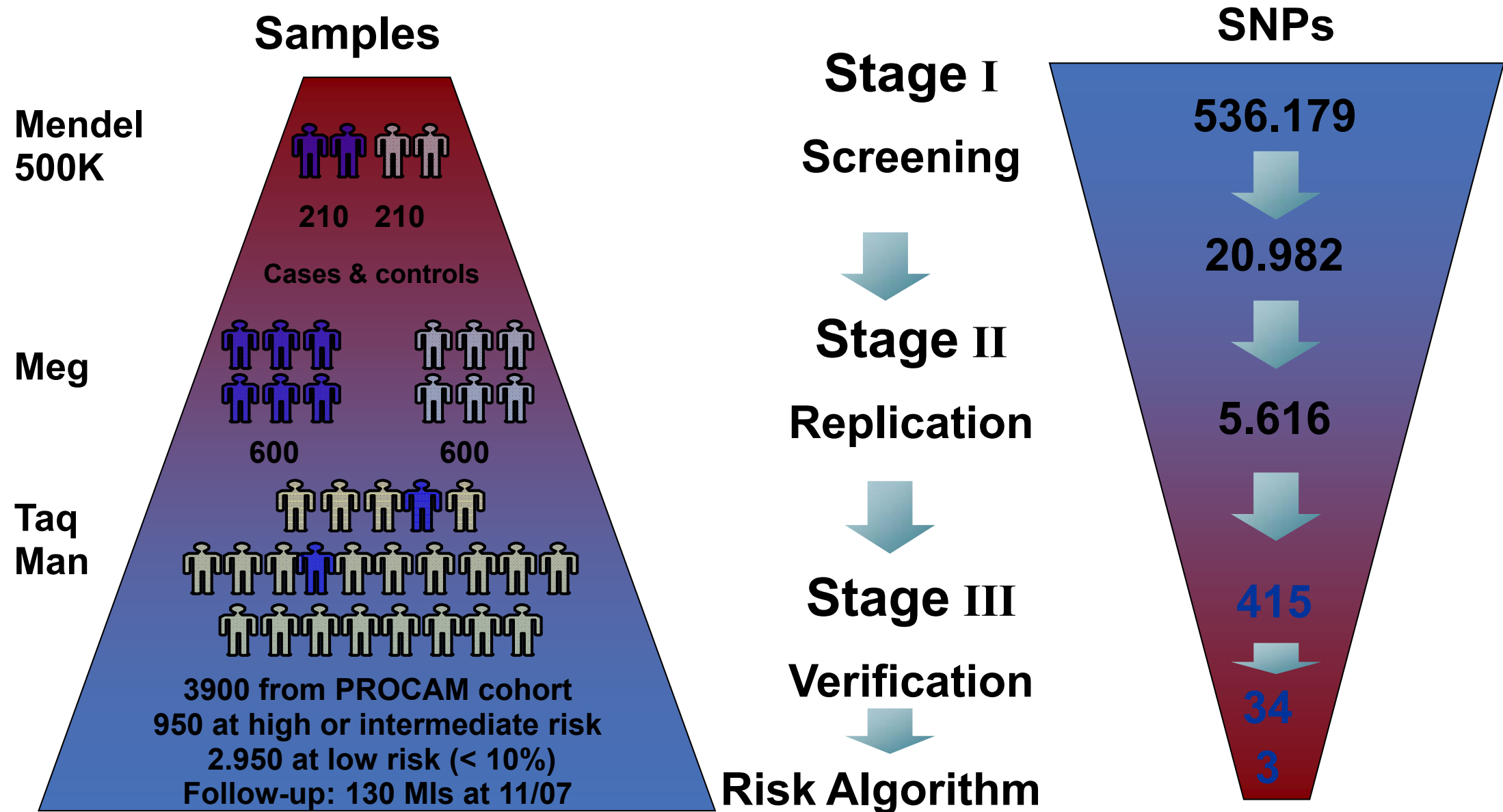
Analysis



Data Analysis II



Multistage Design of the Whole Genome Association Study and SNP-Reduction



The risk calculator

Form1

CHD risk calculation
Neural Networks (MLP) and Log. Regr. (MLF)
Rel. 1.1 27/01/2003 Dr. R. VOSS

AGE in years	0	Blood glucose	0
TG in mg/dl	0	Uric acid mg/dl	0
HDL in mg/dl	0	Smoker ?	0
LDL in mg/dl	0	Diabetes mellit.	0
Diastolic BP	0	Unspecific chest pain	0
Systolic BP	0	Fam. history MI	0
Body mass index	0	Hypertension tablets treatment	0

Risk MLF MLP in %

Visual Basic 6.0
application



COMPAQ
3970
Handheld
Application



Das ist es!
Die Medizin des
21. Jahrhunderts
macht nicht mehr
„Diagnose + Therapie“
sondern nur noch
„Vorhersage +
Vorbeugen“



Das wird doch
nie was! Die meisten
Risikofaktoren sagen
überhaupt nichts
aus
Vorhersagen führen
nur ganz selten zu
einer effektiven
Vorbeugung

Indikation	Gen	Analyse
Hypercholesterinämie	ApoB100, ApoE	Sonden spezifische Echtzeit PCR
Hypercholesterinämie	LDLR, PCSK9	Sequenzierung
Hämochromatose	HFE	Sequenzierung
Morbus Wilson	ATP7B	Sequenzierung
Familiäre adenomatöse Polyposis	APC	Sequenzierung
Solide Tumore	z.B. p53, BRAF, KRAS	Sequenzierung / NGS
Familiäres Mamma Carcinom	BRCA1, BRCA2	Sequenzierung / NGS
MEN2A, MEN2B, familiäres Schilddrüsenkarzinom	RET	Sequenzierung
Pharmakogenetik	Cytochrome (P450) NAT2, TPMT	Sonden spezifische Echtzeit PCR / Sequenzierung
HIV-Infektion	HIV-RNA	Sequenzierung / NGS

Molekulardiagnostik (bitte Rückseite beachten)

Nur mit dunklen
Stift markieren!
falsch

6.1



Centrum für Laboratoriumsmedizin
- Zentrallaboratorium -
MVZ Abteilung für
Laboratoriumsmedizin
Leiter: Dr. med. Bernhard Schlüter



Angaben zu Patient, Probe und Abnahmezeitpunkt

Angaben zum Auftraggeber

Datum: _____
Telefon/Fax: _____
Anfordender: Ärztin/Arzt (Blockschrift) / Unterschrift: _____

Bitte Einverständniserklärung hier einleben



Infos zu Laborparametern und Präanalytik unter: zlab.ukmuenster.de

Wichtig: Vor Durchführung von genetischen Untersuchungen ist nach dem Gendiagnostikgesetz vom 01.02.2010 eine Beratung des Patienten und dessen Einwilligung notwendig! Einwilligungserklärung siehe Rückseite.

Bitte A-Etikett des Doppelticketes hier einleben



Parameter	Genosymbol	Untersuchung	Fragestellung (Beispiele)
☐ alpha1-Antitrypsin	AAT	Polymorphismus M, S, Z	alpha1-Antitrypsindefizienz
☐ Apolipoprotein B100	ApoB-100	Polymorphismus R3500Q, R3500W	Familiär defektes Apolipoprotein B-100
☐ Apolipoprotein E	ApoE	Polymorphismus E2, E3, E4	Dyslipoproteinämie
☐ Apolipoprotein E2	ApoE2	E2 Genotyp	Hyperlipoproteinämie Typ III
☐ Cytochrom P450 2C9	CYP2C9	Nachweis der Allele *2, *3	Cumarin-Resistenz/Sensitivität
☐ Cytochrom P450 2C19	CYP2C19	Nachweis der Allele *2, *3, *17	Clopidogrel-Resistenz
☐ Cytochrom P450 2D6	CYP2D6	Nachweis der Allele *3, *4, *5, *6, *8, *9, *10	Medikamentenwirkung (Tamoxifen, Psychopharmaka)
☐ Dihydropyrimidin-Dehydrogenase	DPD	Exon 14 Skipping	5-Fluorouracil-Toxizität
☐ Faktor II	F2	Polymorphismus G20210A	Thrombophilie
☐ Faktor V	F5	Faktor V Leiden (R506Q)	Thrombophilie
☐ Hämochromatose Typ 1	HFE	Exone 2 und 4 (C282Y, H63D, S65C)	Hämochromatose
☐ Interleukin 28B	IL28B	Polymorphismus rs12979860 (G/T)	Interferon-gamma Wirkung
☐ Methyl-Tetrahydrofolat-Reduktase	MTHFR	Polymorphismus C677T	Hyperhomocysteinämie
☐ Lactasegen Enhancer-Region	LCT	Polymorphismus C-13910T	Lactoseintoleranz
☐ Plasminogen Aktivator Inhibitor 1	PAI-1	Polymorphismus 4G/5G	Thrombophilie
☐ RET-Protoonkogen	RET	Exone 10, 11, 13-16	MEN II, FMTC
☐ Thiopurin-Methyltransferase	TPMT	Exone 5, 7 und 10	TPMT-Defizienz
☐ UDP-Glycosyltransferase	UGT1A1	Polymorphismus TA-Repeat	M. Moulengracht, Irinotecan-Toxizität
☐ Vitamin K-Epoxid Reduktase Komplex 1	VKORC1	Polymorphismus G-1639A	Cumarin-Resistenz/Sensitivität

Weitere genetische Parameter nach Rücksprache (Tel.: 0251-83-47222)

HLA-Immungenetik	Untersuchung	Fragestellung (Beispiele)
☐ HLA-A	Exone 2, 3 und 4 nachzuweisende Allele: _____	
☐ HLA-A29	Nachweis des Allels	Birdshot-Chorioretinopathie
☐ HLA-B	Exone 2, 3 und 4 nachzuweisende Allele: _____	
☐ HLA-B27	Nachweis des Allels	M. Bechterew, seronegative Spondylarthropathien
☐ HLA-B51	Nachweis des Allels	M. Behcet
☐ HLA-B*57:01	Nachweis des Allels	Abacavir-Toxizität
☐ HLA-C	Exone 2, 3 und 4 nachzuweisende Allele: _____	
☐ HLA-Cw6	Nachweis des Allels	Psoriasis vulgaris
☐ HLA-DR	Exon 2 DRB1 nachzuweisende Allele: _____	
☐ HLA-DRB1*15:01	Nachweis des Allels	Narkolepsie
☐ HLA-DQ	Exone 2 und 3 DQB1 nachzuweisende Allele: _____	
☐ HLA-DQB1*06:02	Nachweis des Allels	Narkolepsie
☐ HLA-DQ2/DQ8	Nachweis der Allele DQB1*0201, *0202, *0302	Zöliakie

EDTA 2,7 ml

Einverständniserklärung des Patienten

Ich wünsche die Durchführung der von meinem Arzt / meiner Ärztin vorgeschlagenen genetischen Untersuchung zur Abklärung folgender Erkrankung:

**Zwingend notwendig seit in Kraft treten des
Gendiagnostikgesetzes am 01.02.2010**

Ich bin über Zweck, Art, Umfang, die gesundheitlichen Risiken und Aussagekraft der genetischen Untersuchung ausführlich aufgeklärt worden.

Ich möchte über das Ergebnis der Untersuchung informiert werden: ☐ Ja ☐ Nein

Das Untersuchungsergebnis kann mir auch durch weitere, in gleicher Weise kompetente ärztliche Personen mitgeteilt werden (Vertretungsregelung): ☐ Ja ☐ Nein

Ich bin mit der evtl. erforderlichen Weiterleitung von Probenmaterial an ein spezialisiertes medizinisches Kooperationslabor einverstanden: ☐ Ja ☐ Nein

Ich bin damit einverstanden, dass das Probenmaterial für eine ggf. erforderliche Überprüfung des Ergebnisses, weitere Analysen und zur Qualitätssicherung aufbewahrt wird: ☐ Ja ☐ Nein

Ich bin damit einverstanden, dass das Untersuchungsergebnis über die gesetzlich festgeschriebene Frist von 10 Jahren hinaus aufbewahrt wird: ☐ Ja ☐ Nein

Bei Bedarf dürfen die Ergebnisse der Untersuchung für Beratung und/oder Untersuchungen von Familienmitgliedern (ggf. einzelne Personen benennen) genutzt werden: ☐ Ja ☐ Nein

Jeder Punkt der Einwilligungserklärung kann von mir ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile für mich jederzeit widerrufen werden.

Ich bin damit einverstanden, dass das Untersuchungsergebnis an die von mir benannte ärztliche Person

weitergeleitet wird.

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass

☐ mein Blut ☐ das Blut meines Kindes

entnommen und den notwendigen molekulargenetischen Untersuchungen unterzogen wird.

Ort, Datum

Name, Vorname (Druckschrift)
Patient(in) / Sorgeberechtigte(r)

Unterschrift

Name, Vorname (Druckschrift)
Verantwortliche(r) Ärztin / Arzt

Unterschrift