

Dypsekvensering, er det verdt det?

*En beskrivende analyse med fokus på
kostnadssiden*

Geir Julius Braathen



Masteroppgave ved Institutt for helse og samfunn / Det
medisinske fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

14.05.2019

Dypsekvensering, er det verdt det?

*En beskrivende analyse med fokus på
kostnadssiden*

© Forfatter

2019

Dypsekvensering – er det verdt det?

Geir Julius Braathen

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Representralen, Universitetet i Oslo

Thomas Stearns Eliot

Where is the wisdom we have lost in
knowledge? Where is the knowledge we
have lost in information?

Albert Einstein

If we knew what we were doing, it
wouldn't be called research, would it?

Imagination is more important than
knowledge, for knowledge is limited
while imagination embraces the entire
world.

Sammendrag

Den historiske bakgrunn og teknologiske utvikling var nødvendige forutsetninger for at next generation sequencing (NGS) ble mulig og beskrives innledningsvis i denne masteroppgaven. En gjennomgang av organisering og prøveforløp for NGS beskrives og kostnadselementer ved dypsekvensering identifiseres. Kostnader, arbeidstid, prøvevolum og refusjon kvantifiseres med omtrentlige tallverdier. En sammenligning av kostnadssiden foretas for årene 2015 og 2018. Mitt fokus er på kostnadselementene

Diagnostisk utbytte beskrives. Deretter beskrives metoder for å øke det diagnostiske utbytte for NGS analyser både pre- og postanalytisk.

Ny kunnskap og noen pasientforløp beskrives for belysning av konsekvenser slik at en form for verdsetting illustreres.

Denne mastergraden beskriver et øyeblikksbilde. Utstyr, kostnader, kapasitet, diagnostisk utbytte er i vedvarende utvikling. Metoden blir gradvis enklere å benytte selv om den fortsatt er høyspesialisert og krever særskilt kompetanse.

Denne mastergraden kan være et nyttig utgangspunkt, rammeverk og fundament for mer detaljerte fremtidige økonomiske analyser rundt storskalasekvenseringsmetoder.

Forord

I 2012 begynte vi å utføre dypsekvenseringsanalyser, next-generation sequencing (NGS), i klinisk praksis. I 2015 publiserte vi to artikler som omhandlet dypsekvensering, Arvelige perifere nevropatier diagnostisert ved dypsekvensering og Diagnostisk eksomsekvensering – norske erfaringer. NGS var på denne tiden ansett som for kostbar metode, til å utføres i ordinær praksis.

I 2015 evaluerte vi vår metode, NGS i klinikken med diagnostisk formål. Senere har metoden blitt generelt akseptert både internasjonalt og nasjonalt og er implementert ved alle universitetssykehus i Norge. Genetiske tester / NGS er ofte en forutsetning for persontilpasset medisin siden de genetiske resultater kan definere utfallet av forskjellige behandlingsprosedyrer slik som ved kreft.

I denne sammenheng har bruk av NGS ikke bare økonomisk betydning, men har også viktige konsekvenser for den enkelte pasient, familie og samfunnet for øvrig.

Diskusjonen har vært rundt kostnader ved NGS og uttalelser som for kostbar til å kunne brukes. I dag er temaet mer om bruk, funn og behandlingsmuligheter.

Når nye teknologier implementeres, blir det vesentligste å benytte dem med klokskap til fordel for pasienter, familier og samfunn.

Avslutningsvis vil jeg takke førsteamanensis Knut Reidar Wangen, Avdeling for helseledelse og helseøkonomi for konstruktive samtaler og tilbakemeldinger under utarbeidelsen av denne masteroppgaven.

Innholdsfortegnelse

1	Introduksjon	1
2	Forkortelser	3
3	Bakgrunn	4
3.1	Historikk	5
3.2	DNA.....	6
3.3	Gen.....	7
3.4	Mutasjoner	8
3.5	Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM).....	9
3.6	Sekvensering.....	10
3.7	Det humane genom prosjekt	10
3.8	Dypsekvensering	10
3.9	Tolkning av sekvensvarianter	13
3.10	Refusjon	15
4	Metodologiske betraktninger.....	18
4.1	Ekspertuttalelse.....	18
4.2	Dypsekvensering begrensninger	19
4.3	Innkjøpspriser	20
4.4	Arbeidstid	20
4.5	Andre analyser og utstyr.....	21
4.6	Refusjon.....	21
4.7	Diagnostisk utbytte	22
5	Materiale og metode.....	23
5.1	Systematisk gjennomgang	23
5.1.1	Preanalytisk	23
5.1.2	Analytisk	24
5.1.3	Postanalytisk.....	24
5.2	Dypsekvensering	25
5.2.1	Kapitalkostnader.....	25
5.2.2	Driftsutgifter	26
5.2.3	Arbeidstid	27
5.2.4	Analysevolum.....	28

5.3	Diagnostisk utbytte	28
6	Resultat.....	30
6.1	Kostnader utstyr.....	30
6.2	Kostnader forbruksmateriell og reagenser.....	31
6.3	Kostnader arbeidstid.....	32
6.4	Refusjon.....	36
6.5	Diagnostisk utbytte	38
6.5.1	Preanalytisk optimalisering	38
6.5.2	Reanalyse	38
6.6	Verdsetting.....	39
7	Diskusjon.....	41
7.1	Kostnader.....	41
7.2	Refusjon.....	43
7.3	Diagnostisk utbytte	44
7.4	Verdsetting.....	45
8	Konklusjon	46
9	Litteraturliste	48

1 Introduksjon

Storskalasekvensering også betegnet som next-generation sequencing (NGS) eller dypsekvensering benyttes for å fastlegge nukleotidrekkefølgen i DNA hos et individ. Metoden er mer effektiv enn tradisjonelle metoder, Sangersekvensering, når flere gener skal undersøkes.

NGS benyttes i dag ved flere tilstander, som kreft og nevrologiske sykdommer hvor flere gener er involvert og i syndromdiagnostikk hvor man nødvendigvis ikke har mistanke om en spesifikk diagnose, men mistenker at tilstanden er genetisk.

Genetiske undersøkelser er ofte en forutsetning for senere fremtidig persontilpasset medisin. I dag benyttes resultatet av genetiske analyser ved behandling av forskjellige tilstander slik som proksimal spinal muskel atrofi, nevronal ceroid lipofuscinose type II i tidlig fase og forskjellige former for kreft. Den arvelige tilstanden Føllings sykdom, fenyktonuri (PKU), inngår i nyfødtscreeningen, kan behandles med livslang proteinrestriksjon og fenylalaninfattig diett og krever nøye monitorering av fenylalanin i blod. Det anbefalte området for kvinner med PKU som planlegger graviditet eller er gravide er noe lavere for å unngå fosterskader.

NGS gir mulighet for å identifisere den genetiske årsak til sykdom. Andel av pasienter med funn, funnprosent, er avhengig av diagnostisk problemstilling(1,2).

Metoden er kommet i enda mer vanlig klinisk bruk nasjonalt etter 2015.

Dypsekvenseringsnetoden krever ressursbruk og det er på tide å vurdere metodens kostnader, utbytte og verdsetting. Mitt fokus er på kostnadselementer.

For å identifisere kostnadselementene beskrives først prøveforløp. Kostnadselementene utstyr-, laboratorie- og arbeidstidskostnader samt antall analyser kvantifiseres. Kostnadsnivå i 2015 og 2018 sammenlignes. Estimering av refusjonsbeløp i henhold til poliklinikkforskriften foretas med takster gjeldende for 2019. Metoder som kan øke diagnostisk utbytte beskrives. Verdsetting beskrives ved å belyse noen konsekvenser, ny kunnskap og noen terapieksampler.

Registrering av nasjonale analysekostnader for alle laboratoriekostnader er planlagt utført i løpet av 2019. Dermed blir denne type kostnadsanalyse med sammenligning av tidligere år enda mer relevant enn først antatt. Basis for satsing på persontilpasset medisin er kunnskap om den genetiske konstitusjon. I proposisjon 1 S (2018-2019) regjeringen.no er det nevnt at

det foreslås 6 mill NOK til oppfølging av tiltak i Nasjonal strategi for persontilpasset medisin (2017 -2021) med en samlet bevilgning på vel 25,7 mill NOK i 2019 hvor styrkingen skal gå til oppbygging og drift av en nasjonal anonymisert database over genetiske varianter hos norske pasienter samt kompetansenettverk for persontilpasset medisin.

Dermed blir spørsmålet stillet i tittelen «Dypsekvensering, er det verdt det?» nærmest litt passé, men fortsatt verdt å besvare. I framtiden vil denne form for kunnskap være omdreiningspunktet for framtidige diagnoser og terapier. Noen framtidige vyer nevnes avslutningsvis.

Denne mastergraden beskriver et øyeblikksbilde. Utstyr, kostnader, kapasitet, diagnostisk utbytte er i vedvarende utvikling. Metoden blir gradvis enklere å benytte selv om den fortsatt er høyspesialisert og krever særskilt kompetanse.

2 Forkortelser

	Navn
ACGH	Array komparativ genomisk hybridisering
APN	Arvelige perifere nevropatier
Autosomal	Kjønnsuavhengig
Ataksi	Koordinasjonsforstyrrelse
CMT	Charcot-Marie-Tooth sykdom
<i>De novo</i>	Nyoppstått
DNA	Deoksyribonukleinsyre
Fenotype	Klinisk uttrykksform, egenskap, trekk
HSP	Hereditær spastisk paraparese
MLPA	Multiplex Ligation Probe Amplification
mRNA	messenger RNA
NGS	Next-generation sequencing / Dypsekvensering / Storskalasekvensering
Proband	Indekstilfellet i en familie / første affiserte familiemedlem som gjorde at man kom i kontakt med familien
Recessiv	Vikende
RNA	Ribonukleinsyre
Tilfeldig funn	Påvisning av en sekvensvariant som er årsak til eller medfører økt risiko for en sykdom / tilstand som ikke har sammenheng med indikasjon for analysen
tRNA	transfer RNA
Utilsiktet funn	Se tilfeldig funn
VUS	Variant of unknown significance / variant av ukjent betydning

3 Bakgrunn

Oppdagelsen av deoksyribonukleinsyre (DNA), de teknologiske framskritt med laboratorieanalyser som kunne lese av baserekkefølgen, sekvensen, i DNA og kartleggingen av det humane genom gjorde at dypsekvensering senere ble mulig.

Dypsekvensering brukes til bestemmelse av baserekkefølgen i arvemassen, DNA sekvensen. Dypsekvensering betegnes også som Next-generation sequencing (NGS), High throughput sequencing (HTS), massiv parallell sekvensering eller storskalasekvensering..

DNA hos mennesket befinner seg i all hovedsak i cellenes kjerne(3,4). DNA er å betrakte som en plantegning eller oppskrift for cellens egenskaper og bestemmer hvordan organismen ser ut og fungerer. Oppskriften for det enkelte element, eksempelvis blodtype, kalles gen.

Ved celledeling kopieres arvemassen, DNA replikasjon, slik at dattercellene får likt DNA.

Ved dypsekvensering kan store deler av arvemassen kartlegges samtidig, eksempelvis det som kommer til uttrykk, dvs. eksom. Ved sammenligning med kjente referansesekvenser fra friske personer kan man så gjøre antagelser rundt sekvensvarianter og genetisk sykdom.

I dag er dypsekvensering også kommersielt tilgjengelig fra flere aktører slik at privatpersoner kan kartlegge sin arvemasse blant annet ved å sende en spyttprøve pr. post utenlands, A-Magasinet 25.01.2019. I lederen er det angitt:

«Glem kirkebøker og håndtegnede slektstrær. Nå er det nok med noen hundrelapper og en spyttklyse på en vattpinne så kan du få avdekket hele din bakgrunn. Siden årtusenskiftet, da genteknologien åpnet opp for private og kommersielle DNA-tester har mange millioner benyttet seg av muligheten.»

«Nå vokser det opp en stor, ny industri. Oppsiden er at du selv kan velge mellom mange leverandører. Men kan vi stole på testene? Og hva kan vi bruke svarene til?»

Det har vist seg at man kan få helt forskjellige analyser om sin etnisitet og bakgrunn fra de ulike kommersielle firmaene, og resultatene av denne type genetiske tester har fortsatt først og fremst underholdningsverdi.

Videre i dette kapittelet har jeg belyst de forskjellige elementer og kunnskapsområder som sammen dannet grunnlaget for at dypsekvensering ble mulig.

3.1 Historikk

Antropologen, psykologen og statistikeren Francis Galton, Charles Darwins fetter, var opptatt av variasjonene innenfor menneskearten(3). Han var påvirket av den tids herskende utviklingsteori – katastrofeteori som i motsetning til skapelsesteorien, kunne forklare forekomsten av forskjellige fossiler i geologisk forskjellige lag. Teorien gikk ut på at ved slutten av hver periode i Jordens historie skjedde en verdensomfattende katastrofe med tilintetgjørelse av alt liv, og ved innledningen av neste periode ble livet skapt på nytt og i en høyere utviklet form.

Francis Galton mente at forskjeller i evner og anlegg var arvelig bestemt, og han utviklet statistiske metoder for beskrivelse av egenskapers variasjon. Begrepet eugenikk ble introdusert av Galton, og viser til forbedring av populasjoner ved å selekere de beste eksemplarer for avl, jfr. side 396 i boken *Genetics in Medicine*(5). Plante- og dyreoppdrettere har fulgt disse prinsippene i uminnelige tider.

Charles Darwin utga sin evolusjonsteori, evolusjon via naturlig utvalg, i arbeidet, *The Origin of Species*, i 1859, mer enn 20 år etter hans jordomseiling med skipet *Beagle* hvor han hentet mange av sine observasjoner(6). Arbeidets originaltittel var: *On the Origin of Species by Means of Natural Selection or, The Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*. Det rådende og statiske synet den gang var at artene ikke hadde endret seg fra tidspunktet de ble guddommelig skapt(3). Jordomseilingen med *Beagle* varte i 5 år fra 1831, og særlig det biologiske mangfold Darwin erfarte fra studier av fossile pattedyr fra Sør-Amerika og fuglefaunaen på Galapagos bidro til at han utviklet sin teori om evolusjon via naturlig utvalg. Elementer av det biologiske mangfold framkommer ved dypsekvensering hvor det humane genetiske mangfold undersøkes i form av genetisk variasjon på nukleinsyrenivå.

Augustinerabbeden og naturfagslæreren Gregor Mendels studier av ertheplanters utseende, fenotype, i klosterhagen i Brno ga grunnlaget for arvelovene lenge før man kjente til kromosomer eller gener(4). Han konsentrerte seg om en eller to veldefinerte egenskaper hos plantene, og førte statistikk over hvordan disse egenskapene fordelte seg hos hybridene og deres avkom. Han publiserte sitt arbeid, *Versuche über Pflanzenhybriden*, i 1865, arbeidet ble

forstått rundt 35 år senere, og først i vårt århundre er Mendels arvelover blitt fullt ut forklart ut fra kromosomstudier og gransking av celledelingens mekanismer jfr. side 2 i boken Human Genetics(7).

De Mendelske arvelover er prinsippet om segregering, 1. lov, og prinsippet om uavhengig fordeling, 2. lov(3) De konstante arvefaktorene, senere kalt gener, opptrer parvis og skiller lag, segregerer, ved dannelse av kjønnsceller. Alle arvefaktorene eller anleggsparene fordeles uavhengig av hverandre slik at det er tilfeldig hvilke som kommer sammen i en kjønnselle.

Autosomal dominant, autosomal recessiv og kjønnsbundet arvegang har så vært utledet fra disse forhold. Forhold rundt arvegang benyttes regelmessig under tolkningen av sekvensvarianter i DNA

3.2 DNA

Miescher oppdaget DNA i 1869 mens han arbeidet i laboratoriet til Felix Hoppe-Seyler ved Universitetet i Tübingen(8). Han hadde identifisert en ny kjemisk substans fra cellekjernene i leukocytter. Han kalte det nye molekylet for nuclein siden det var påvist i nucleus, cellekjernen. Senere viste han at nuclein var en vesentlig bestanddel av alle cellekjerner. Han antok at dette molekylet var uløselig knyttet til denne organellens funksjon. Miescher antok at nuclein kunne ha en rolle for overføring av arvelige egenskaper. I ettertid forkastet han denne spekulasjonen.

Avery, MacLeod og McCarty publiserte I 1944 sitt banebrytende arbeid som tydet på at DNA og ikke proteiner, som man tidligere hadde antatt, var bærere av genetisk informasjon(9).

Chargaff oppdaget rundt 1950 at base sammensetningen av DNA varierte mellom arter, men innenfor arter er basene til stede i bestemte forhold slik at mengden av purin baser og av pyrimidine baser alltid er 1:1, base par regelen(10,11). Dermed er purin basene adenin (A) og guanin (G) til stede med forholdstallet 1:1 og pyrimidin basene thymin (T) og cytosin (C) er også til stede i forholdstallet 1:1, også betegnet som Chargaffs regel.

Hershey og Chase bekreftet i 1952 at DNA virkelig var det genetiske materialet(12).

Røntgen krystallografi undersøkelsene til Franklin og Wilkins medførte at Watson og Crick løste DNA molekylets oppbygning(13). Strukturen er en høyredreide dobbelt heliks hvor

DNA trådene er motsatt rettet slik at basene i dobbeltmolekylet vender innover mot hverandre.

På midten av 1960 –tallet ble den genetiske kode avslørt, og Nirenberg, Khorana og Holley mottok i 1968 Nobelprisen i fysiologi og medisin for dette arbeidet(14).

Den genetiske kode består av triplerter, tre baser, hvor mulighetene med 4 baser i hver posisjon blir $4 \times 4 \times 4 = 64$. Dermed kan det kodes for alle 20 aminosyrer og flere triplerter koder for samme aminosyre. Startkodon i et gen er ATG (DNA) og AUG (RNA) og avleses inntil stopp kodon.

DNA koden i et gen omskrives, transcriberes, til budbringer RNA (mRNA) som så oversettes ved hjelp av tRNA til en aminosyrekjede, dvs. dette genets protein, jfr. side 18 i boken Genetics in Medicine(5). Det sentrale dogme innen genetikken er DNA → RNA → Protein. I mRNA er basen thymin erstattet med uracil (U), tabell 1(15).

Tabell 1. Den genetiske kode(15).

1. BASE	2. BASE				3. BASE
	U	C	A	G	
U	Fenylalanin	Serin	Tyrosin	Cystein	U
	Fenylalanin	Serin	Tyrosin	Cystein	C
	Leucin	Serin	Stopp	Stopp	A
	Leucin	Serin	Stopp	Tryptofan	G
C	Leucin	Prolin	Histidin	Arginin	U
	Leucin	Prolin	Histidin	Arginin	C
	Leucin	Prolin	Glutamin	Arginin	A
	Leucin	Prolin	Glutamin	Arginin	G
A	Isoleucin	Treonin	Asparagin	Serin	U
	Isoleucin	Treonin	Asparagin	Serin	C
	Metionin	Treonin	Lysin	Arginin	A
	Metionin	Treonin	Lysin	Arginin	G
G	Valin	Alanin	Asparagin- syre	Glycin	U
	Valin	Alanin	Asparagin- syre	Glycin	C
	Valin	Alanin	Glutamin- syre	Glycin	A
	Valin	Alanin	Glutamin- syre	Glycin	G

3.3 Gen

Arveanlegg eller gen er oppskriften for en egenskap hos levende organismer, jfr. side 20-22 og 404 i boken Genetics in Medicine (3,5). Molekylært blir dette en kromosomal DNA sekvens som er nødvendig for å danne et funksjonelt protein.

Et gen består av promotor region, startkodon, eksoner, introner, stopp kodon samt enhancere silencere og locus control region.

Eksoner er den transkriberte delen DNA som gjenfinnes i modent mRNA og kan translateres til en aminosyresekvens.

Introner er DNA segmentene av et gen som transkriberes, men som fjernes fra det primære RNA transcript. Dette skjer ved at sekvensene, eksonene, på hver side av intronet spleises sammen.

Promotor regionen, slik som TATA boks, er viktig for initiering av transkripsjonen og er ofte 25-30 nukleinsyrer oppstrøms for startkodon.

Enhancere og silencere påvirker transkripsjonen, og er DNA segmenter ofte flere tusen baser, kb, vekk fra selve genet. Locus control region påvirker transkripsjonen mer overordnet og kan kontrollere transkripsjonen av et cluster av gener.

Posisjonen et gen har på kromosomet kalles locus, forskjellige former av et gen kalles allel og forskjellige former av et gen (allel) kan okkupere locus. Antallet gener er rundt 20.000.

3.4 Mutasjoner

Under replikasjonen av DNA, dannelse av 2 identiske kopier DNA fra et DNA molekyl, kan det skje feil under polymeriseringen, dannelsen av den andre strengen(3-5,7). Disse feilene eller mutasjonene kan påvirke organismens fenotype og særlig hvis feilen er plassert i den proteinkodende delen av et gen. Feil frekvensen, error raten, for DNA polymerasen er beregnet å være i størrelsesorden 1 feil pr. 10-100 millioner baser. Det humane genom består av rundt 3 milliarder baser. Den proteinkodende del av genomet utgjør 1-1,5% av genomet.

En mutasjon er en endring av basesekvensen.

Punktmutasjonene som kan forekomme er:

Missense mutasjon hvor kodonet endres slik at det introduseres en annen aminosyre

Nonsense mutasjon hvor kodonet endres til et stopp

Silent mutasjon hvor kodonet endres, men aminosyren endres ikke

Rammeskift, frameshift, mutasjonene endrer leserammen til et gen.

I dette tilfellet introduseres eller fjernes baser, insersjoner eller delesjoner (Indels) og endringen er ikke delelig på 3 slik at leserammen endres.

Mutasjoner kan gi skade og sykdom, være nøytrale, eller noen ganger være fordelaktige.

3.5 Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)

I 1966 publiserte Victor A. McKusick første utgave av katalogen Mendelian Inheritance in Man (MIM)(16). OMIM er en katalog over gener, arvelige sykdommer og fenotyper med særlig fokus på sammenhengen mellom gener og fenotyper. I perioden 1966 – 1998 ble det publisert til sammen 12 utgaver av MIM. Fra 1995 ved hjelp av National Center for Biotechnology Information har katalogen vært online, OMIM, fritt tilgjengelig på internett. Den første utgaven inneholdt 1 486 innføringer, og nesten alle diskuterte fenotyper. Pr. februar 2019 er det 24 889 innføringer, og de fleste er om gener, tabell 2.

Tabell 2. OMIM statistikk over innføringer 1966-2019, vist pr. 20. februar 2019.

Forstavelse MIM Nummer	Autosomal	Kjønns-bundet (X)	Holandrisk (Y)	Mitokondriell	Total
Gen beskrivelse	15 226	732	49	37	16 044
Gen og fenotype, kombinert	46	0	0	0	46
Fenotypisk beskrivelse, molekylær basis kjent	5 102	331	4	33	5 470
Fenotypisk beskrivelse, molekylær basis ukjent	1 443	123	4	0	1 570
Andre, hovedsaklig fenotyper med mistenkt mendelsk basis	1 651	105	3	0	1 759
Total	23 468	1 291	60	70	24 889

3.6 Sekvensering

Sekvensering er å bestemme baserekkefølgen i et DNA fragment. Sanger og medarbeidere utviklet i 1977 metode for å avlese baserekkefølgen i DNA (17,18). Sanger fikk sin andre nobelpris i kjemi, 1980, for denne oppdagelsen(3). Sangersekvensering har i rundt 40 år vært den vanligst benyttede sekvenseringsmetode. Andre metoder har vært Pyrosekvensering og True single molecule sequencing.

3.7 Det humane genom prosjekt

Human Genome Organisation (HUGO) ble stiftet i 1988 i Sveits av 32 vitenskapsmenn fra 14 land(19). Formålet var å etablere internasjonalt samarbeid for å sekvensere det humane genom og skaffe finansiering. Tidligere kjente man til enkelte biter, sekvenser, av kjerne-DNA samt fra 1981 mitokondriegenomet(20).

Human Genome Project (HGP) ble offisielt etablert i 1990, hadde et budsjett på 3 milliarder USD, og formålet var å kartlegge hele det eukromatiske humane genom i løpet av 15 år(21). Den teknologiske utvikling gjorde at målet ble nådd i 2001 til en pris av 2,7 milliarder for finansår 1991 USD.

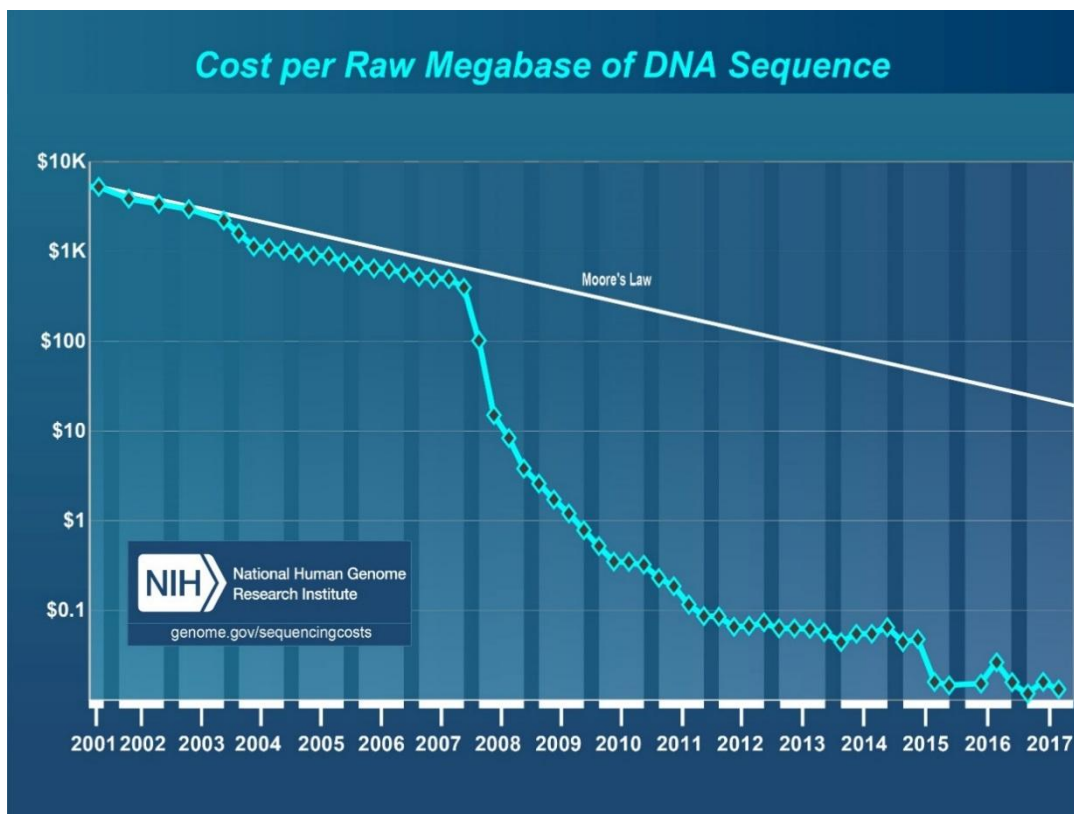
Fra 1997 var det også et privat initiativ, Celera genomics, for å kartlegge det humane genom, og begge initiativ publiserte sine data i 2001, henholdsvis i Nature og Science(22,23).

3.8 Dypsekvensering

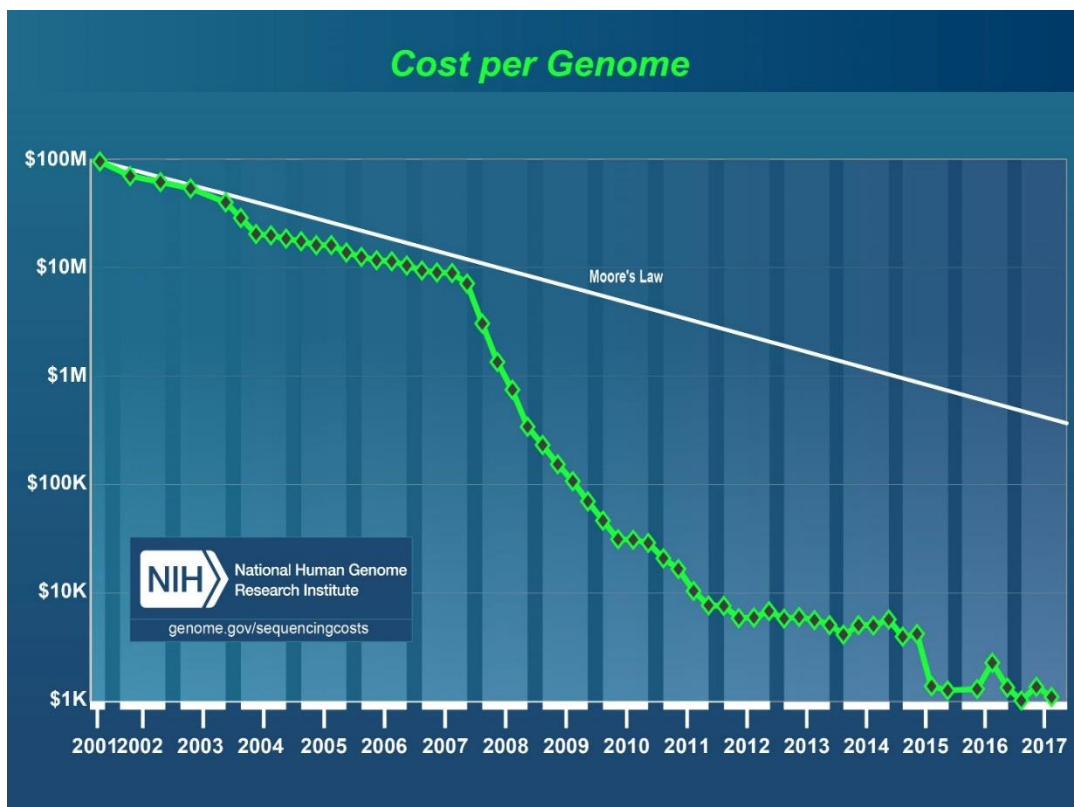
I dag benyttes storskalasekvenseringsmetoder ofte betegnet som massiv parallell sekvensering, dypsekvensering, next-generation sequencing (NGS) eller high-throughput sequencing (HTS) hvor mange DNA fragmenter analyseres samtidig(24). Tidligere sekvenserte man et og et fragment inntil funn, en kostbar og tidkrevende prosess(25).

I dag kan hele eller deler av genomet sekvenseres på kort tid.

Selve sekvenseringskostnadene har gradvis avtatt, figur 1 og 2(26). Kostnader for vurdering av sekvensvarianter er ikke inkludert.



Figur 1. Estimerte Sekvenseringskostnader pr. Megabase DNA sekvens for perioden 2000 – 2017, NIH, NHGRI, genome.gov.sequencingcosts(26).



Figur 2 Estimerte sekvenseringskostnader pr. genom for perioden 2000 – 2017, NIH, NHGRI, genome.gov.sequencingcosts(26).

Dypsekvenseringstilbudet omfatter tilpasset (custom), målrettet (targeted), eksom og genom analyse.

Kjemikalier og paneler har begrenset holdbarhet. Ved bestilling av standardpaneler, eksompaneler, og kjemikalier sikrer leverandør kvaliteten i henhold til gitte standarder. Ved bestilling av tilpassete paneler må mottaker, laboratoriet som skal utføre analysene, utføre kvalitetskontroll og sikre at de mottatte custom panel er i samsvar med bestillingsspesifikasjonene.

Tilpasset analyse, panel med fysisk anrikete gener

Ved tilpasset, custom, analyse er det analyse av et panel med fysisk anrikete gener bestilt fra fabrikanten etter spesifikasjoner gitt fra laboratoriet. Forutsetningen ved bruk av custom panel er at analysebehovet for den gitte problemstilling forekommer regelmessig nok og at man mottar prøver i et stort nok antall.

Fordelen er at man unngår tilfeldige funn eller utilsiktede funn da det undersøkes kun for gener knyttet til problemstillingen. I tillegg øker man dybde og dekning for de analyserte gener og flere prøver kan analyseres samtidig. Ulempen er at man kan ikke åpne for analyse av andre gener hvis problemstillingen i et gitt tilfelle viser seg å være annerledes enn først antatt. Da må prøven, undersøkes på ny.

Hvis det i litteraturen kommer til nye gener for en gitt problemstilling etter at et tilpasset panel er bestilt, vil dette fysiske panelet ikke inneholde de nye genene. De nye genene kan først inkluderes ved neste bestilling.

Målrettet analyse, eksom med bioinformatisk filtrering

Ved målrettet, targeted, analyse utføres analysen som ved eksom analyse hvor alle kjente gener blir undersøkt. Eksom anriker alle protein kodende gener (ca. 20 000), eksoner (ca. 180.000), i genomet.

Imidlertid er den bioinformatiske analysen målrettet da kun genene av interesse for en definert problemstilling blir filtrert ut og undersøkt. Den bioinformatiske analysen blir mindre arbeidskrevende enn ved en ufiltrert eksom analyse, og muligheten for tilfeldige funn reduseres. En annen fordel er at man bioinformatisk kan åpne for undersøkelse av hele eksomet dersom man ikke fikk svar på problemstillingen, normalt svar, og man fortsatt antar at problemstillingen er genetisk.

En ulempe ved eksompanel er at dybde og dekningsgrad ikke nødvendigvis er tilstrekkelig i alle områder, og antallet prøver man kan kjøre samtidig er mer begrenset enn ved fysisk anrikete paneler.

Eksom analyse

Ved eksom, heleksom, analyse blir alle kjente gener, 1-1,5% av arvemassen, undersøkt og bioinformatisk analysert. Eksom analyse utføres oftest som trioanalyse, dvs. barn, mor og far. Problemstillingen blir da å undersøke for *de novo* sekvensvarianter som foreldre ikke har og pasienten har eller for sekvensvarianter barnet har i homozygot eller blandet heterozygot form hvor foreldre er friske bærere.

Genom analyse

Ved genomanalyse analyseres hele arvemassen. Denne analysen benyttes foreløpig sjelden diagnostisk. Hittil har denne analysen vært forbeholdt forskning og særskilt utvalgte kasus uten funn ved eksom analyse. Genomanalyse genererer betydelig mer data og er vanskeligere å tolke da kunnskap om sekvensvarianter i genomet fortsatt er begrenset(27,28).

Undersøkelse av andre affiserte i en slekt

Når den sykdomsgivende sekvensvariant, mutasjon, er påvist i en slekt, undersøkes andre i slekten med spørsmål om samme tilstand med Sangersekvensering hvor kun den aktuelle sekvensvarianten analyseres. Sangersekvensering av kun et amplicon er en billigere metode.

3.9 Tolkning av sekvensvarianter

Et eksom omfatter ca. 30 Mb, består av omtrent 180.000 exoner og har i gjennomsnitt rundt 17.200 sekvensvarianter, men hos noen forekommer mer enn 56.000 sekvensvarianter, publikasjon fra 2009(29). I en studie fra 2015 som sammenlignet funn ved eksom og genom sekvensering er det angitt at man ved eksomsekvensering fant i gjennomsnitt 97.517 sekvensvarianter fordelt på 84,192 enkelt base varianter og 13,325 indels(27).

Variant oppkallet ved exom tolkningen skjer ofte etter en recessiv / dominant *de novo* modell(30).

I tolkningsarbeidet er tilgang til databaser og prediksjonsverktøy viktige(31,32). Ved eksom undersøkelser er foreldreprøver, trio undersøkelse, av betydning for å kunne tolke resultatet.

Tolkning av den enkelte sekvensvariant utføres i henhold til ACMG retningslinjer(33). Sekvensvariantene påvist ved genotypingen tolkes og klassifiseres i klassene 1; benign, 2; sannsynlig benign, 3; variant av ukjent betydning, 4; sannsynlig patogen og 5; patogen.

ACMG retningslinjene beskriver en prosess for klassifikasjon basert på kriterier hvor forskjellige typer variantbevis vektet. Av betydning for klassifikasjonen er populasjonsdatabaser, som The Genome Aggregation Database (gnomAD) (<https://gnomad.broadinstitute.org/>), Exome Aggregation Consortium (<http://exac.broadinstitute.org/>), Exome Variant Server (<http://evs.gs.washington.edu/EVS>) 1000 Genomes (<http://browser.1000genomes.org>), og dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>), sykdomsdatabaser, som Human Gene Mutation Database (<http://www.hgmd.org>), DECIPHER (<http://decipher.sanger.ac.uk>), ClinVar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>) og OMIM (<http://www.omim.org>), sekvensdatabaser, som NCBI Genome (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>) og RefSeqGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/rsg>), segregasjonsdata fra familien og in silico prediktive algoritmer for missense og spleise varianter, som SIFT (<http://sift.jcvi.org>), Align GVGD (http://agvgd.iarc.fr/agvgd_input.php), PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>), MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org>), GeneSplicer (http://www.cbc.edu/software/GeneSplicer/gene_spl.shtml) og PhyloP (<http://compgen.bscb.cornell.edu/phast/>).

Fra analysebeskrivelsen refereres følgende:

«Sekvensvarianter som finnes hos friske kontrollpersoner og andre publiserte normalt forekommende varianter filtreres bort under dataanalysen. Hvis affiserte/uaffiserte slektninger også er sekvensert, brukes også denne informasjonen til å snevre inn antall potensielt patogene varianter. De resterende sekvensvariantene vurderes særskilt for å avgjøre om de kan være årsak til sykdom. Eventuelle varianter som er sannsynlig årsak til sykdom blir verifisert ved Sanger-sekvensering. Det er mulig at noen sekvensvarianter kan tolkes annerledes i framtiden, grunnet økende klinisk eller genetisk forståelse.»

3.10 Refusjon

Forskrift om godtgjørelse for å yte poliklinisk helsehjelp i spesialisthelsetjenesten (poliklinikkforskriften) FOR-2007-12-19-1761 sist endret i FOR-2018-12-19-2138 fra 01.01.2019 hjemler i kapittel 4 Refusjonssatser for Laboratorieundersøkelser og prøver(34).

Det er angitt følgende:

«For at medisinske laboratorier skal kunne kreve inn takstene, må virksomheten være godkjent i henhold til forskrift 1. desember 2000 nr. 1276 om medisinsk laboratorie- og røntgenvirksomhet gitt i medhold av spesialisthelsetjenesteloven § 2-1 fjerde ledd, § 4-1 og § 5-2 fjerde ledd. For at sykehus skal kunne kreve inn takstene, må laboratorievirksomheten være en del av den godkjente virksomheten ved sykehuset i henhold til bestemmelser gitt i medhold av spesialisthelsetjenesteloven § 4-1.

Til enhver analysekode i NLK er det knyttet én og bare én unik refusjonssats (kronebeløp). I «Finansieringsordning for polikliniske laboratorieanalyser for statlige helseinstitusjoner – regler for fremsettelse av refusjonskrav 2019» med vedlegg, framgår det hvilken refusjonskategori den enkelte laboratorieanalyse er plassert i.

Det kan kreves refusjon for de laboratorieanalysene som inngår i Norsk laboratoriekodeverk (NLK). Se kodeveiledning, jf. merknad R1.

Et gyldig refusjonskrav må minst inneholde en kode, samt det refusjonsbeløp som kreves, jf. merknad R1.»

Medisinsk genetik er angitt på følgende måte:

5 Medisinsk genetik

Refusjonskategori	Refusjon i kroner	Merknad
MG0	0,78	R1, R2
MG1	156,53	R1, R2
MG2	293,49	R1, R2
MG3	528,28	R1, R2
MG4	1 108,15	R1, R2
MG5	2 569,94	R1, R2
MG6	7 015,71	R1, R2
MG7	12 000,00	R1, R2
MG8	17 176,50	R1, R2

Merknad R1:

Se følgende dokumenter på hjemmesidene til Direktoratet for e-helse (www.ehelse.no): Norsk laboratoriekodeverk og veileder i norsk laboratoriekodeverk. Regelverket for den polikliniske finansieringsordningen finnes på Helfos nettsider (www.helfo.no): «Finansieringsordning for polikliniske laboratorieanalyser for statlige

helseinstitusjoner – regler for fremsettelse av refusjonskrav 2019» med vedlegg der det framgår hvilken refusjonskategori den enkelte laboratorieanalyse er plassert i.

Merknad R2:

Refusjon for NOR-koder innen medisinsk genetikk kan kun kreves av medisinsk genetiske laboratorier med godkjente spesialister innen medisinsk genetikk. Refusjon kan kun kreves for undersøkelser av fødte individer. Det kan likevel kreves refusjon for non-invasive prenatal testing (NIPT) for påvisning av trisomi 13, 18 og 21.

Norsk laboratoriekodeverk (NLK) er et felles kodeverk med analyse- og undersøkelseskoder for laboratoriefagområdene inkludert medisinsk genetikk utgitt av Direktoratet for e-helse(35). I dokumentet Regelverk og refusjon for sjukehus og poliklinikk nevnes finansieringsordningen for poliklinisk virksomhet, dvs. rammetilskudd, refusjon fra Helfo og betaling av egenandeler fra pasientene(36).

I vedlegget «Laboratoriekoder som gir rett til refusjon – statlige helseinstitusjoner (CSV)», er refusjonskategori og øvrige detaljer for den enkelte laboratoriekode nevnt.

De relevante medisinsk genetiske takstene, i denne sammenheng er:

FAGOMRAADE_NLK KODE	FRADATO	Medisinsk genetikk NORSK_BRUKSNAVN	REFUSJONS- KATEGORI	REFUSJON
NOR25439	22.03.19	DNA-Gensekvensering analysepakke	MG6	7 015,71
NOR35103	22.03.19	DNA-Gensekvensering analysepakke inkl. kopitallsanalyse	MG7	12 000,00
NOR25444	22.03.19	DNA-Eksomsekvensering	MG8	17 176,50
NOR35057	01.01.19	DNA-Eksom-/genomsekvensering fam.ktr.	MG7	12 000,00
NOR35104	22.03.19	DNA-Eksomsekvensering inkl. kopitallsanalyse	MG8	17 176,50
NOR25445	22.03.19	DNA-Genomsekvensering	MG8	17 176,50
NOR35105	22.03.19	DNA-Genomsekvensering inkl. kopitallsanalyse	MG8	17 176,50

I dokumentet Finansieringsordning for polikliniske laboratorieanalyser for statlige helseinstitusjoner – regler for fremsettelse av refusjonskrav 1. januar 2018 er det blant annet angitt(37):

«Omlegging til ny finansieringsordning skal gjennomføres budsjettneøytralt på nasjonalt nivå i 2018. På lengre sikt skal den normative føringen for fastsettelse av refusjonssatser være at den nye aktivitetsbaserte refusjonsordningen skal dekke 40 %

av de samlede kostnadene for laboratorieanalyser som utføres poliklinisk ved statlige helseinstitusjoner.»

Jeg har i de videre beregninger under Resultat valgt å benytte koder gjeldende for 2019 da det for tidligere år ikke var publisert tilsvarende refusjonsdetaljer for storskalasekvensering.

4 Metodologiske betraktninger

Min bakgrunn er nevnt i dette kapitelet da jeg benytter min kunnskap og erfaring som en ekspertuttalelse. Tallene som fremkommer i dette dokument er i den størrelsesorden som jeg husker dem. De er ikke helseforetakets reelle tall for utstyr, reagenser eller prøvevolum.

4.1 Ekspertuttalelse

Jeg har arbeidet ved Sykehuset Telemark som seksjonsoverlege i medisinsk genetikk siden 2005. Jeg har doktorgrad, PhD, og er spesialist i medisinsk genetikk og spesialist i nevrologi.

I denne perioden, 2005 - 2019 har antallet ansatte økt fra 4-5 til 25-30. Antallet legespesialister har økt fra 1 til 5. Metoderepertoaret ble utvidet først med array komparativ genomisk hybridisering (ACGH) og Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) og så med Dypsekvensering.

Høsten 2008 estimerte jeg antatt prøveantall, inntekter og utgifter for ACGH metoden. ACGH var dengang betegnet som den moderne form for kromosomanalyse.

Antatt prøveantall var beregnet ut fra antall mottatte kromosomprøver fra to fylker for syndromal problemstilling i løpet av 2007 og 2008. Potensialet for antall slike undersøkelser var imidlertid større. Ved å ta utgangspunkt i antall prøver pr. måned i Telemark for de siste 20 måneder og befolkningens størrelse i nabofylkene pr. 1. januar 2008 (www.ssb.no) kunne antall prøver estimeres på et epidemiologisk grunnlag.

Potensiell driftsinntekt, utstyrskostnader for Agilent High-Res Microarray Skanner Bundle (2-10 µm), G2565CA, laboratoriekostnader og arbeidsutgifter ble beregnet inkludert en balanse mellom estimerte inntekter og utgifter gitt 5 års utstyrsavskrivning. Estimateret var konservativt utført.

ACGH utstyr ble vedtatt innkjøpt av sykehuset ultimo 2008 med krav om balanse etter 5 års drift. Etter ca. 2 års drift var 5 års målene nådd.

Dypsekvensering, NGS eller massiv parallell storskalasekvensering er den moderne form for sekvensering av gener hvor mange gener kan sekvenseres samtidig. Sommeren 2010 estimerte jeg antatt prøveantall, inntekter og utgifter for NGS metoden på tilsvarende måte som nevnt

over. Våren 2012 etter at utstyret var mottatt, metoden var etablert og utprøvd i et vitenskapelig materiale, gjentok jeg analysen med antatt prøveantall 120 eksom og 240 fysisk anrikete paneler pr. år (32).

Gammelt takstsystem for laboratorieanalyser var ikke ment for de mer moderne metodene som ACGH og NGS. Nasjonalt hadde man før 2008 etablert praksis for takstbruk ved ACGH metoden. Ved beregning av refusjonsnivå for NGS tok jeg hensyn til kostnadsestimater og refusjonsnivå for ACGH analysen og ekstrapolerte disse parametrene konservativt til NGS metoden da vi var de første til å benytte denne metoden i klinisk praksis. Forskningsmessig var NGS benyttet nasjonalt i en årrekke.

Jeg hørte dengang fra kolleger innenfor medisinsk genetikk at de syntes refusjonsnivået hos oss var for høyt, men etter at de selv etablerte metoden de påfølgende år framkom det at de syntes vårt refusjonsnivå var for lavt. Jeg har derfor antatt at det forelå en rimelig balanse mellom kostnader og refusjon for disse årene. Imidlertid er utstyret blitt mer effektivt, reagenskostnadene har blitt gradvis billigere og tidsbruk for tolkning er blitt redusert slik at regelmessige kostnadsanalyser av metoden for å avklare omtrentlig nasjonalt refusjonsnivå fortsatt er hensiktsmessig.

Studiet innenfor Helseadministrasjons har nå gitt meg mulighet til å foreta analyser på mer helseøkonomisk basis av allerede ervervet NGS utstyr.

4.2 Dypsekvensering begrensninger

Dypsekvenseringstilbudet omfatter tilpasset (custom), målrettet (targeted), eksom og genom analyse. Genomanalyse er foreløpig ikke implementert ved Sykehuset Telemark da den vil kreve hele den eksisterende sekvenseringskapasitet eller innkjøp av nytt utstyr. Genomanalyse er derfor holdt utenfor de videre helseøkonomiske betraktninger.

Det refereres fra analysebeskrivelsen angående forutsetninger:

Fullstendig sekvensinformasjon for alle genområder oppnås ikke, og sekvensvarianter i ikke-sekvenserte områder kan dermed ikke påvises. Ved negative svar, er det satt som krav at mer enn 90 % av nukleinsyrene skal sekvenseres i gjennomsnitt mer enn 20 ganger, slik at risikoen for å miste relevante sekvensvarianter blir minst mulig.

Analysen påviser ikke større duplikasjoner, delesjoner, mosaikisme eller repeterte elementer.

4.3 Innkjøpspriser

Covaris til DNA fragmentering var innkjøpt i Euro, øvrig utstyr og reagenser var kjøpt eller kjøpes inn i USD. Estimatenes er gjort i NOK. Det er ikke justert for svingninger i valutakurs.

Ved å innhente foretakets nøyaktige innkjøpspriser kunne beregningene ha vært presise. De nøyaktige innkjøpspriser for Illumina HiScanSQ og så Illumina NextSeqTM500 har jeg ikke, kun omtrentlig erindret pris i NOK. Inflasjonsjustering av de nominelle priser er ikke foretatt.

Reagensutgiftene har endret seg fra oppstart i 2012. Inntrykket er at kostnaden for reagensutgifter for Illumina NextSeqTM500 har vært forholdsvis stabile fra 2015 sammenholdt mot priser i 2018 - 2019. Reagensutgiftene pr. analyse var betydelig høyere for Illumina HiScanSQ som ble benyttet inntil 2015.

4.4 Arbeidstid

NGS arbeidet er tidkrevende og består av mange elementer hvor tidsbruk kan variere betraktelig også for de samme analyseoppgaver. For å kartlegge gjeldende reell tidsbruk vil nøyaktige tidsmålinger være nyttig framfor de foretatte estimater.

De historiske arbeidstidsestimatene er omtrentlige og beregnet for 2015. 2015 er valgt da først dette året nådde man prøveantallet pr. år som var estimert våren 2012. Detaljer i brukt arbeidstid for 2015 er mindre detaljerte og presise enn for 2018.

Arbeidstid for å kontrollere fysisk anrikete genpaneler kan være fra 1-3 ukers arbeid for bioinformatiker og vanligvis 1 – 2 uker. Ved mangler blir det i analyseoppsettet nødvendig å supplere med Sangersekvensering for de manglende områder. Sangersekvenseringen krever annet utstyr, reagenser og arbeidstid for å designe primere, foreta analysen og tolke resultatene.

Utgifter for å implementere batch av nye ikke tidligere brukte reagenser eller fra annen leverandør, som krever endring av analytisk pipeline, er ikke tatt med.

4.5 Andre analyser og utstyr

Andre analyser er nødvendig for å kunne få et resultat ved Dypsekvensering. Dette gjelder DNA ekstraksjon og Real time PCR konsentrasjonsmåling i løpet av prøveopparbeiding samt verifisering av påviste antatt patogene sekvensvarianter ved Sangersekvensering.

PCR maskiner, Real-time PCR utstyr og Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyser er nødvendig for de ovennevnte analyser. I tillegg benyttes utstyr for DNA ekstraksjon og Beckman Coulter Biomek Fx^P Laboratory Automation Workstation i prøveopparbeidingen for Dypsekvenseringen. Dette utstyret benyttes også for andre analyser. Utstyrsutgiftene er ikke inkludert i kostnadsberegningen for Dypsekvenseringen.

Sangersekvensering for annen problemstilling utløser refusjonstakst innenfor refusjonskategori MG5 NOK 2 569,94, jfr. kapittelet Bakgrunn, Refusjon.

4.6 Refusjon

Refusjonsbeløp for dypsekvenserings analysen, poliklinisk takst er angitt i kapittel 3.10. Gjeldende refusjonsordning er benyttet da den inneholder koder og refusjonsbeløp for storskalsekvensering / NGS / dypsekvensering. Egenandeler fra pasienten kommer ikke til anvendelse ved denne type analyser, jfr. Regelverk og refusjon for sjukehus og poliklinikk.

Det er ikke foretatt sammenligning med tidligere takstsystem og refusjonsbeløp da tidligere takstsystem ikke var tilpasset de mer moderne metoder. Det kan også ha forekommet individuelle forskjeller i bruk mellom de forskjellige medisinsk genetiske avdelinger da det i tidligere takstsystem forelå elementer av tolkning og mulighet for skjønn.

Metoder som er nødvendig for å få et Dypsekvenseringsresultat er inkludert i refusjonen. Dette inkluderer verifisering av påviste antatt patogene sekvensvarianter ved Sangersekvensering. Kostnadsberegning for utstyr, reagenser og arbeidstid for Sangersekvensering er ikke inkludert i kostnadsberegningen for Dypsekvensering.

Kostnadsberegningene er gjort pr. analysetype. Refusjonstakster gjelder pr. prøve. En prøve kan gjennomgå flere NGS analyser avhengig av hvor klar problemstillingen er. Refusjonsestimatet utført i denne oppgaven er gjort pr. analyse og så korrigert med en faktor, på 0,8, da det er antatt at 20% av prøvene kan ha flere NGS analyser samtidig.

4.7 Diagnostisk utbytte

Forutsetningen for preanalytisk optimalisering av diagnostisk utbytte er at det allerede er foretatt såpass mange NGS analyser at man beregne funn frekvens f.eks. relatert til alder ved APN panel (arvelige perifere nevropatier).

Ved eksomsekvensering kan man i enkelte tilfelle øke det diagnostiske utbytte, funnprosenten, ved å reanalysere tidligere prøver uten funn dersom kvaliteten på rådataene tilfredsstillir dagens situasjon. Det finnes p.t. ikke Helfo aktivitetstakster for denne type reanalyse. Etter min mening tilhører denne type reanalyse heller laboratoriets kvalitetssikring av egne analyser og drift. Aktiviteten faller dermed innenfor rammetilskuddet og bør ikke medføre særskilt refusjon, jfr. poliklinikkforskriften.

5 Materiale og metode

En gjennomgang av dagens organisering og prøveforløp beskrives før kostnader ved dypsekvensering identifiseres og kvantifiseres. Det foretas en sammenligning mellom 2015 og 2018. Deretter beskrives metoder for å øke det diagnostiske utbytte for NGS analyser.

Valutakurser er hentet fra nettsidene til Den norske Bank(38).

5.1 Systematisk gjennomgang

Medisinsk genetikk er i helsevesenet registrert og organisert som en klinisk spesialitet med særlig ansvar for å ta hånd om familier med genetisk betingede tilstander og sykdommer. Spesialiteten inneholder også vesentlig laboratorie-genetisk virksomhet, molekylærgenetikk og cytogenetikk(39).

Medisinsk genetisk virksomhet utføres ved Oslo universitetssykehus, Haukeland universitetssykehus, St. Olavs hospital HF, Sykehuset Telemark og Universitetssykehuset Nord-Norge. Avhengig av avdelingenes størrelse er feltet inndelt i seksjoner og fagområder. NGS analyser utføres også ved noen andre helseforetak slik som Akershus universitetssykehus.

I det videre forholdet jeg meg til egen virksomhet, Sykehuset Telemark, hvor jeg kjenner organisering og drift. Vårt laboratorium er akkreditert i henhold til standard fra Norsk Akkreditering og analysene er akkreditert i henhold til ISO15189.

Jeg har inndelt prøveforløpet i en preanalytisk, analytisk og postanalytisk del som beskriver prøvenes vandring gjennom den medisinsk genetiske avdeling fra prøvemottak til svar foreligger.

5.1.1 Preanalytisk

Ved prøvemottak registreres nye prøver og opplysningene på rekvisisjonen registreres slik som personalia, kliniske opplysninger og ønskede analyser. Overlege med ansvar for prøvemottak gjennomgår rekvisisjonene, vurderer foreslåtte analyser og innhenter evt. tilleggsopplysninger samt stadfester type undersøkelse, diagnostisk eller bærerundersøkelse, da prosedyreforløp er forskjellig, jfr. kapittel 5, §5-1 litra a og b. i Bioteknologiloven(40).

De mottatte rekvisisjoner for analyse gjennomgås ukentlig i møte mellom sekretariat, overlege og personale fra de enkelte fagområder - kromosom, array comparativ genomisk hybridisering ACGH), Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), Sanger- og Dypsekvensering hvor planen for videre håndtering av den enkelte prøve stadfestes.

5.1.2 Analytisk

Etter prøvemottak ekstraheres DNA, DNA konsentrasjon og renhet måles og eventuell Real-time PCR konsentrasjonsbestemmelse utføres med tanke på de planlagte molekylærgenetiske analyser.

En enkelt prøve kan gjennomgå flere analyser avhengig av problemstilling. Cellekultur etableres for de prøver som skal til kromosomanalyse. Ved spørsmål om arvelige perifere nevropatier (APN) og arvelige spastiske parapareser (HSP) utføres MLPA før NGS. Ved ataksier utføres analyse for ekspansjoner oftest før dypsekvensering for ataksi. Før NGS eksom, avhengig av problemstilling, kan ACGH og forskjellige MLPA analyser ha vært foretatt. MLPA og ACGH er enklere, billigere og raskere utførte analyser enn dypsekvensering. Påvises det funn ved noen de andre relevante analysene avlyses dypsekvenseringen da årsaken er påvist.

5.1.3 Postanalytisk

Laboratorieteknikerne godkjenner analysen, kontrollerer det laboratorietekniske og godkjenner resultatet. Metodeansvarlig gjør den siste kontroll og signerer svaret eller lager forslag til svar. Overlege mottar svarbrevet for signering eller ferdigstiller utkastet.

Alle dypsekvenseringssvar, målrettet, tilpasset og eksom, gjennomgås i møte mellom overleger, bioinformatiker, molekylærbiologer og teknisk personale før signering. Noen prøver blir tatt opp på møtet flere ganger før analysesvaret kan bli ferdigstillet.

Svartid for de fleste av våre analyser er 1 måned mens svartid for dypsekvensering er 4 måneder.

5.2 Dypsekvensering

NGS arbeidsmetoden gjennomgås. Kostnadene fordeles i henhold til kapitalkostnader, driftskostnader og lønn.

Dypsekvenseringsmetoden medfører kapitalkostnader, og omfatter investering i nødvendig utstyr, datamaskiner, nettverk og servere samt diverse databaser, eksterne og egne samt utgifter til lokaler og oppvarming. Human Gene Mutation Database (HGMD), GNOMAD og tilgang til forskjellige prediksjonsverktøy er nødvendig for å kunne tolke resultatene. Denne type verktøy er også relevant for andre analyser slik som Sangersekvensering og er ikke inkludert.

Driftsutgifter til forbruksmateriell og reagenser samt lønnsutgifter, tidsbruk, som kan direkte knyttes til NGS metoden er inkludert. Serviceutgifter for NGS utstyret er ikke inkludert.

Aktivitet og tidsbruks estimater er basert på beste gjettning hvor Bayes teorem er benyttet for å få et overslag over spredningen. De omtrentlige minimums- og maksimumsverdiene er satt i egne kolonner etter verdien som angir beste skjønn.

Direkte kostnader er inkludert mens indirekte kostnader er holdt utenfor beregningen. Utgifter til IT, datamaskiner, infrastruktur, programvare og servere samt administrasjon, lokaler, oppvarming og renhold er holdt utenfor. Kostnader til annet laboratorieutstyr som PCR maskiner, robot og Real time PCR er holdt utenfor da dette utstyret benyttes til flere forskjellige analyser og ikke bare for NGS teknologien.

Arbeidstid som ikke er direkte analyserelatert er holdt utenfor. Dette gjelder arbeidstid for å opprettholde kompetanse, sikre avdelingens drift og øvrige forefallende bruk av arbeidstid.

Medfølgende aktiviteter som konsultasjoner og andre analyser er ikke inkludert i beregningen.

5.2.1 Kapitalkostnader

Utstyr som har vært benyttet er Illumina HiScanSQ og så Illumina NextSeq™500.

Levetid for Illumina HiScanSQ var til siste halvdel av 2015, dvs. så lenge produsent hadde produksjon av reagenser til utstyret og vi hadde igjen reagenser. Siden har Illumina NextSeq™500 vært benyttet. DNA fragmentering foregikk først med Covaris utstyr og siden

med enzymatisk metode for Illumina NextSeqTM500. Priser er omtrentlige, slik jeg erindrer dem. Utstyrsparken ble endret høsten 2015 hvor det var en overgangsfase. For enkelhets skyld har jeg valgt at kvartal 1-3 er knyttet til Illumina HiScanSQ og siste kvartal til Illumina NextSeqTM500. Illumina NextSeqTM500 benyttes fortsatt.

Medisinsk utstyr har vanligvis en avskrivningsperiode på 10 år og kan ha enda lengre levetid. Levetid for denne type moderne høyteknologi utstyr er ofte kortere illustrert ved at Illumina HiScanSQ kunne benyttes mindre enn 4 år, tabell 3. Fem års avskrivningsperiode er valgt.

Forutsetningen for beregningen er nominelle omtrentlig valgte tall ved innkjøpstidspunkt som ikke er inflasjonsjustert.

Tabell 3. Oversikt over utstyr og omtrentlige nominelle valgte tall samt driftsperiode.

Utstyr	Pris	Driftsperiode	
		Fra - til	Måneder
Illumina HiScanSQ	3 000 000,00	01.01.12 – 31.09.15	45
& Covaris	500 000,00	01.01.12 – 31.09.15	45
Illumina NextSeq TM 500	2 500 000,00	01.10.15 - 31.03.19	42

Kapasiteten har endret seg. En kjøring på Illumina HiScanSQ tok 10 dager før neste batch av prøver kunne settes på maskinen. I realiteten hadde man to oppsett i måneden. Prøveantallet, som man tidligere samtidig kunne kjøre, var omtrent halvparten av dagens kapasitet.

En kjøring på Illumina NextSeqTM500 tar 30 timer før neste batch av prøver kan settes på maskinen. Det vanlige nå er 1-2 oppsett i uken, dvs. 1,25 (1-3) innenfor omtrent ordinær arbeidstid.

En kjøring i dag kan bestå av inntil 12 eksomer eller inntil 36 fysisk anrikete custom paneler. Ofte kjøres variasjoner av dette, slik som 4 eksomer og 24 paneler, 6 eksomer og 18 paneler, 8 eksomer og 12 paneler, 9 eksomer og 9 paneler.

5.2.2 Driftsutgifter

Forbruksmateriell som benyttes er først og fremst Pippetespisser og annet plastmateriell. Reagenser benyttes til DNA ekstraksjon, enzymatisk DNA fragmentering, NGS sekvensering samt Real time PCR for konsentrasjonsmålinger. Reagensutgiftene har hele tiden vært en vesentlig kostnad selv om prisene gradvis har avtatt.

Priser er oppgitt i dagens priser. Forutsetningen for beregningen er nominelle omtrentlig valgte tall ved innkjøpstidspunkt.

Reagenser har begrenset holdbarhet. Innkjøp er vanligvis for 48 eller 96 analyser for eksom og for 96 - 192 analyser for fysisk anriket panel.

Dagens priser er benyttet for 2018 og for sammenligningen priser fra 2015.

5.2.3 Arbeidstid

Avdelingen har 25-30 ansatte, de fleste er laboratoriemedarbeidere og 5 er overleger. 10 har PhD.

Dypsekvenseringsanalysen krever særskilt kompetanse fra alt involvert personell, laboratoriepersonell, bioinformatiker og leger.

Arbeidsprosedyren for NGS beskrives dag for dag inkludert tidsestimat for de enkelte arbeidsoppgavene. Omtrentlig medgått arbeidstid for laboratoriepersonell, bioinformatiker og leger er inkludert.

Ved bruk av fysisk anriket panel er det nødvendig med bioinformatisk gjennomgang av dekningsgrad og dybde.

Forutsetningen for tidsberegningen er arbeidsoppgavene slik de utføres i dag. Tidsestimatene er omtrentlige og forutsetter at arbeidsflyten fungerer uten forsinkelser eller uventede hendelser. En overordnet vurdering av tidsbruk er så gjort inkludert et spredningsmål.

Tidsbruk ved prøvemottak, registrering og lagring er holdt utenfor denne oversikten over tidsberegning.

Antall tekniske omkjøringer, dvs. gjentatte prøvearbeid og instrumentkjøring er i størrelsesorden 10%. Før oppstart, 2011 var antall omkjøringer estimert til inntil 10%.

Tolkningsarbeidet og svarmøtet tok lenger tid før. Svarmøtene i 2015 omfattet færre prøver og kun 1 overlege deltok.

Gjennomsnittlig årslønn for involvert laboratoriepersonell og bioinformatiker er vurdert å være i størrelsesorden NOK 600.000. Gjennomsnittlig årslønn for involverte overleger er

vurdert å være i størrelsesorden NOK 1.000.000. Faktor på 1,4 er benyttet for å beregne de totale arbeidskraftkostnader.

Det er justert for endring i lønn mellom 2015 og 2018. For justering er det benyttet endring i minimumslønnsatser for overleger ved Sykehuset Telemark(41). Minimumslønnsats for overleger var i 2015 NOK 695 000 og i 2018 NOK 761 400. altså en 9,55% lønnsøkning fra 2015 til 2018. Korreksjonsfaktoren for 2015 blir 0,91 (695000/761400). Denne korreksjonsfaktor benyttes også for lønn til laboratoriepersonell og bioinformatiker.

5.2.4 Analysevolum

Behovet for NGS analyser har vært økende. Det forutsettes og er benyttet omtrentlige tall.

Årstall som er valgt benyttet er 2015 og 2018, tabell 4. 2015 var det siste året Illumina HiScanSQ ble benyttet og først i 2015 oppnådde man tidligere estimert årlig prøveantall. Illumina NextSeqTM500 ble benyttet i 2018. Begge årene hadde høyere prøveantall enn de foregående årene.

Tabell 4. Oversikt over analyseantall dypsekvensering for 2015, 9 måneder, og 2018, NGS fysisk anriket panel, bioinformatisk filterert eksom og heleksom.

Årstall (antall mnd)	IlluminaHiScan SQ		Illumina NextSeq500	
	2015 (9)		2018 (12)	
Antall analyser	N	(%)	N	(%)
Fysisk anriket panel	210	(70)	455	(35)
Filtrert eksom	30	(10)	650	(50)
Helesom	60	(20)	195	(15)
Sum	300	(100)	1 300	(100)

5.3 Diagnostisk utbytte

I 2015 publiserte vi to artikler som omhandlet dypsekvensering, Arvelige perifere nevropatier diagnostisert ved dypsekvensering og Diagnostisk eksomsekvensering – norske erfaringer (1,2)

I løpet av mars 2018 ble diagnostisk utbytte for dypsekvensering for arvelige perifere nevropatier (APN) revurdert. Våre tidligere funn ved arvelige perifere nevropatier inkludert

Charcot-Marie-Tooth sykdom (CMT) ga oss et godt utgangspunkt for å vurdere våre data(1,32,42). Ved gjennomgang av det totale materialet observerte vi en lav funnprosent hos henviste pasienter som var eldre enn 60 år.

I 2015 publiserte vi våre erfaringer ved dypsekvensering(2). Observasjonsstudien av 125 personer fra 46 familier identifiserte patogene sekvensvarianter hos 15 av 46 probander og VUS hos 12 probander. Diagnostisk utbytte for de påviste antatt patogene sekvensvarianter var dermed 15 av 46 (33%) familier. 31 familier var altså uten funn av patogen sekvensvariant, 19 med negativt resultat og 12 med VUS.

Fire av disse 31 familiene har siden vært revurdert og bioinformatisk reanalysert.

Prøveopparbeiding og bruk av Illumina NextSeqTM500 var dermed ikke nødvendig.

6 Resultat

Dypsekvenseringsutgifter som direkte kan identifiseres for den enkelte prøve er inkludert.

Dette omfatter laboratoriekostnader og beregnet medgått arbeidstid for personell. Årene 2015 og 2018 er benyttet for å sammenligne kostnader pr. prøve. Dagens kostnader for reagenser er benyttet for 2018. Tolkningsarbeidet tok lenger tid før. Lønnsøkning i denne perioden har vært 9,55%.

6.1 Kostnader utstyr

Utstyrsutgiftene er kostnadsberegnet som et serielån, saldoavskrivning, 5 års avdragstid er valgt og rentefot 4%, tabell 5.

Tabell 5. Oversikt over de to utstyrssett, omtrentlig pris og 5 års avskrivningstid med 4% rentefot.

År	Utstyr	Beløp	Rente		Avskrivning		Total
			4%	Avdrag	Rente		
	ILLUMINA HiScanSQ & Covaris	3 000 000 500 000					
1	2012	Utstyrspakke 1	3 500 000	0,04	700 000	140 000	840 000
2	2013		2 800 000	0,04	700 000	112 000	812 000
3	2014		2 100 000	0,04	700 000	84 000	784 000
4	2015	Utstyrspakke 1	1 400 000	0,04	700 000	56 000	756 000
		ILLUMINA NextSeq	2 500 000	0,04	500 000	100 000	600 000
5	2016	Utstyrspakke 1	700 000	0,04	700 000	28 000	728 000
		ILLUMINA NextSeq	2 000 000	0,04	500 000	80 000	580 000
6	2017		1 500 000	0,04	500 000	60 000	560 000
7	2018		1 000 000	0,04	500 000	40 000	540 000
8	2019		500 000	0,04	500 000	20 000	520 000
9	2020		0	0,04	0	0	0
10	2021		0	0,04	0	0	0
		Sum:			6 000 000	720 000	6 720 000
	ILLUMINA HiScanSQ & Covaris				3 500 000	420 000	3 920 000
	ILLUMINA NextSeq				2 500 000	300 000	2 800 000

Kurs: 1 USD = 5,6155 NOK i september 2011 og 8,2495 i august 2015. Kurs 1 Euro = 7,7292 NOK i september 2011.

De to antatt mest representative årene er valgt for å beregne utstyrs kostnader pr. analyse. Tabell 6 viser utstyrs kostnader pr. analyse for 9 måneder i 2015 og for 12 måneder i 2018 med to forskjellige typer utstyr, jfr. tabell 5. Utstyrs kostnadene pr analyse er beregnet til NOK 1820,00 for Illumina HiScanSQ i 2015 og NOK 415,38 for Illumina NextSeq™500 i 2018.

Tabell 6. Utstyrs kostnader pr. analyse for Illumina HiScanSQ i 2015 og for Illumina NextSeq™500 i 2018.

	År (mnd)	Årlig			Antall prøver	Kostnad pr. prøve
		Avskrivning	Rente	Total		
Illumina HiScanSQ & Covaris	2015 (9)	525 000	21 000	546 000	300	1 820,00
Illumina NextSeq	2018 (12)	500 000	40 000	540 000	1 300	415,38

6.2 Kostnader forbruksmateriell og reagenser

Forbruksmateriell som benyttes er først og fremst Pippetespisser og plastmateriell. Reagenser benyttes til DNA ekstraksjon, enzymatisk DNA fragmentering, NGS sekvensering samt Real time PCR for konsentrasjonsmålinger. NGS sekvenseringsreagenser kjøpes inn i USD. Omtrentlige gjeldende utgifter i 2018 for NGS tilpasset panel med fysisk anrikete gener, gjeldende eksom og et eksomtilbud i 2019 fra annen leverandør er angitt i tabell 7. Dette eksomtilbudet planlegges tatt i bruk i løpet av 2019. For sammenligningens skyld er valutakurser for 2018 benyttet også for denne beregningen.. Ved bioinformatisk filtrert eksom, dvs. målrettet analyse, og eksom benyttes laboriekostnader for eksom.

Tabell 7. Gjeldende omtrentlige priser i 2018 for laboriekostnader pr prøve og analysetype.

Laboriekostnader	Pr. 12 prøver USD	Pr. prøve NOK	Tilpasset	Eksom	Tilbud
Forbruksmateriell					
Pippetespisser mm		50,00	50,00	50,00	50,00
Reagenser					
DNA ekstraksjon		86,00	86,00	86,00	86,00
Real time PCR		50,00	50,00	50,00	50,00
NGS sekvensering Illumina					
Tilpasset	2 400,00	1 627,02	1 627,02		
Eksom	6 000,00	4 067,55		4 067,55	
Enzymatisk DNA fragmentering inkludert					

Tilbud eksom ny leverandør	4 920,00	3 335,39		3 335,39
Enzymatisk DNA fragmentering	480,00	325,40		325,40
Sum tilbud:	5 400,00	3 660,80		
10% Reanalyse ¹			172,70	416,76
				376,08
			1 985,72	4 670,31
				4 222,87

Kurs: 1 USD = 8,1351 NOK i 2018. ¹Unntatt DNA ekstraksjon

Omtrentlige gjeldende utgifter i 2015 for NGS tilpasset panel med fysisk anrikete gener, og for eksom med Illumina HiScanSQ er angitt i tabell 8. Priser i 2015 fra leverandør er tilgjengelig på Illuminas nettsider(43).

Tabell 8. Gjeldende omtrentlige priser i 2015 for laboratoriekostnader pr prøve og analysetype.

Laboratoriekostnader	Pr. 24 prøver USD	Pr. prøve NOK	Tilpasset	Eksom
Forbruksmaterieell				
Pippettespisser mm		50,00	50,00	50,00
Reagenser				
DNA ekstraksjon		86,00	86,00	86,00
Andre reagenser		300,00	300,00	300,00
NGS sekvensering Illumina				
Tilpasset				
NGS library prep & enrichment, Agilent		1 333,33	1 333,33	
NGS clustering på Illumina				
cBot	4 150,00	1 394,40	1 394,40	
NGS sequencing Illumina				
HiScan SQ	3 825,00	1 285,20	1 285,20	
Eksom				
NGS library prep & enrichment, TruSeq Exome	9 520,00	3 198,72		3 198,72
NGS clustering på Illumina				
Cbot	4 150,00	1 394,40		1 394,40
NGS sequencing Illumina				
HiScan SQ	5 875,00	1 974,00		1 974,00
10% Reanalyse ¹			436,29	691,71
			4 885,23	7 694,83

Kurs: 1 USD = 8,0640 NOK i 2015. ¹Unntatt DNA ekstraksjon

6.3 Kostnader arbeidstid

Arbeidsprosedyren for NGS beskrives dag for dag inkludert tidsestimat for de enkelte arbeidsoppgavene slik de utføres nå, 2018 og 2019, tabell 9. Et minimums og maksimums

estimat er også angitt. Rekjøringer er inkludert i beregningen og er på empirisk grunnlag i størrelsesorden 10%.

Tabell 9. Gjeldende oversikt over arbeidsoppgaver og omtrentlig medgått arbeidstid.

Dag	Arbeidsoppgaver	Antall prøver	Varighet (minutter)	Tidsbruk pr. prøve		
				Gj.sn.	Min	Maks
<i>Prøvearbeid, 1 person</i>						
1	Finne fram prøvene Måle konsentrasjon og fortynne	96	450	4,7		
2	Prøveopparbeiding Enzym, adaptere for sekvensering Rensing x 2 og måle konsentrasjon	96	450	4,7		
3	Justere til lik prøve konsentrasjon Sette opp 1. hybridisering, tar 12 timer	96	225	2,3		
4	Capture Hybridisert og hente ut områder, vaske Sette opp 2. hybridisering, tar 12 timer	96	225	2,3		
5	Capture 2 Vaske, PCR 10-12 cykler, ny vask Real time PCR konsentrasjonsmåling	96	450	4,7		
6	Vurdere Real time resultat og fortynne Templat settes på instrument, 12 prøver	12	225	18,8		
			Sum prøvearbeid:	37,5		
			≈	40,0	30,0	60,0
	Antall rekjøringer 10%			4,0	3,0	6,0
			Sum:	44,0	33,0	66,0
<i>Dypsekvensering</i>						
	Instrumentkjøringen tar 30 timer					
<i>Bioinformatiker 1-3 uker, 96-192 analyser</i>						
	Kontroll av fysisk anriket panel	144	2700,0	18,8	15,6	46,9
<i>Resultatarbeid</i>						
	Pipeline, tar 2 dager, datakjøring Bioinformatiker arbeid 2-3 timer, 1 person	12	120	10,0	10,0	15,0
	Sortert på tag og lagt i mapper Alignet mot referansesekvens Antall rekjøringer 10%			1,0	1,0	1,5
			Sum:	11	11,0	16,5

<i>Tolkningsarbeid, 1 person</i>					
Tilpasset analyse, genpanel, 4-8 prøver /dag	6	450	75,0	56,3	112,5
Målrettet, filtrert eksom 1-8 prøver /dag	4	450	112,5	56,3	450,0
Eksom, trio 1-4 prøver /dag	2	450	225,0	112,5	450,0
Sporadisk behov for legearbeid 1/20 prøver	0,05		1,5	0,8	12,0
 <i>NGS svarmøte inntil 2 timer, 25-30 svar 8-10 personer</i>					
1-3 overleger	25	120	9,6	4,8	14,4
1 bioinformatiker	25	120	4,8	4,8	4,8
5-6 laboratoriepersonell	25	120	28,8	24,0	28,8
<hr/>					
1 arbeidsdag er 7,5 timer = 450 minutter					

Tabell 10 viser arbeidskostnader pr prøve og analysetype for 2018 mens tabell 11 er for 2015. Første del av arbeidsprosedyren var forskjellig i 2015, prøvearbeid, men tidsbruken for prøvearbeid var i samme størrelsesorden. Tolkningsarbeid og svarmøte tok lengre tid i 2015.

Tabell 10. Arbeidskostnader pr. prøve og analysetype for 2018.

Arbeidskostnader pr. prøve	2018 Minutter	Pr. minutt NOK	Analysetype			
			Tilpasset	Filtrert	Eksom	
<i>Prøvearbeid, 1 person</i>						
Sum:	44,0	8,00	352,00	352,00	352,00	
<i>Bioinformatiker</i>						
Kontroll av fysisk anriket panel	18,8	8,00	150,00			
<i>Resultatarbeid</i>						
<i>Bioinformatiker arbeid</i>						
Sum:	11,0	8,00	88,00	88,00	88,00	
<i>Tolkningsarbeid, 1 person</i>						
Tilpasset analyse, genpanel	75,0	8,00	600,00			
Målrettet, filtrert eksom	112,5	8,00		900,00		
Eksom, trio	225,0	8,00			1 800,00	
Sporadisk legearbeid	1,5	13,33	20,00	20,00	20,00	
<i>NGS svarmøte</i>						
2 overleger	9,6	26,67	256,00	256,00	256,00	
1 bioinformatiker	4,8	8,00	38,40	38,40	38,40	
6 laboratoriepersonell	28,8	8,00	230,40	230,40	230,40	
Sum arbeidskostnader:			1 734,80	1 884,80	2 784,80	

1 årsverk er satt til 1750 timer

Tabell 11. Arbeidskostnader pr. prøve og analysetype for 2015.

Arbeidskostnader pr. prøve	2015 Minutter	Pr. minutt NOK	Analysetype			
			Tilpasset	Filtrert	Eksom	
<i>Prøvearbeid, 1 person</i>						
Sum:	44,0	7,28	320,32	320,32	320,32	
<i>Bioinformatiker</i>						
Kontroll av fysisk anriket panel	18,8	7,28	136,50			
<i>Resultatarbeid</i>						
<i>Bioinformatiker arbeid</i>						
Sum:	11,0	7,28	80,08	80,08	80,08	
<i>Tolkningsarbeid, 1 person</i>						
Tilpasset analyse, genpanel	240,0	7,28	1 747,20			
Målrettet, filtrert eksom	240,0	7,28		1 747,20		
Eksom, trio	1 200,0	7,28				8 736,00
Sporadisk legearbeid	15,0	12,13	182,00	182,00	182,00	
<i>NGS svarmøte</i>						
1 overlege	15,0	12,13	182,00	182,00	182,00	
1 bioinformatiker	15,0	7,28	109,20	109,20	109,20	
6 laboratoriepersonell	90,0	7,28	655,20	655,20	655,20	
Sum arbeidskostnader:			3 412,50	3 276,00	10 264,80	

1 årsverk er satt til 1750 timer

Tabell 12 viser de omtrentlig beregnede totale kostnader for årene 2015 og 2015 samt gjennomsnittskostnad og grensekostnad for den enkelte analysetype.

Tabell 12. Sammenligning av omtrentlige beregnede totale kostnader mellom årene 2015 og 2018. Gjennomsnittskostnad og grensekostnad for den enkelte analysetype i 2015 og 2018 er angitt.

År (antall måneder)	2015 (9)		2018 (12)			
	Pr. analyse	Antall		Pr. analyse	Antall	
Utstyrskostnader	1 820,00	300	546 000,00	415,38	1 300	540 000,00
Laboratoriekostnader						
Fysisk anriket panel	4 885,23	210	1 025 897,60	1 985,72	455	903 503,51
Filtrert eksom	7 694,83	30	230 844,96	4 670,31	650	3 035 698,25
Heleksom	7 694,83	60	461 689,92	4 670,31	195	910 709,48
Arbeidskostnader						
Fysisk anriket panel	3 412,50	210	716 625,00	1 734,80	455	789 334,00
Filtrert eksom	3 276,00	30	98 280,00	1 884,80	650	1 225 120,00
Heleksom	10 264,80	60	615 888,00	2 784,80	195	543 036,00
Sum:			3 695 225,48			7 947 401,24
Pr. måned			410 580,61			662 283,44
Pr. 12 måneder			4 926 967,31			7 947 401,24
Gj.sn pr. analyse			12 317,42			6 113,39
Gjennomsnittskostnad						
Fysisk anriket panel	10 117,73			4 135,91		
Filtrert eksom	12 790,83			6 970,49		
Heleksom	19 779,63			7 870,49		
Grensekostnad						
Fysisk anriket panel	8 297,73			3 720,52		
Filtrert eksom	10 970,83			6 555,11		
Heleksom	17 959,63			7 455,11		

6.4 Refusjon

For 2018 er det foretatt refusjonsanslag, jfr. kapittelet Bakgrunn, Refusjon.

Det er antatt, kun estimer, at av de 1300 analysene faller 30% (390) innenfor refusjonskategori MG6 med kode NOR25439, 55% (715) innenfor refusjonskategori MG7 med kode NOR35103, 5% (65) innenfor refusjonskategori MG8 med kode NOR25444 og 10% (130) innenfor refusjonskategori MG7 med kode NOR35057. Tabell 13 viser refusjonsestimatet.

Tabell 13 Beregnet omtrentlig refusjonsestimat.

Refusjonskode	Refusjonskategori	Refusjon	Antall	Beløp
NOR25439	MG6	7015,71	390	2 736 126,90
NOR35103	MG7	12000,00	715	8 580 000,00
NOR25444	MG8	17176,50	65	1 116 472,50
NOR35057	MG7	12000,00	130	1 560 000,00
			1 300	
			Sum:	13 992 599,40
Korreksjonsfaktor	0,7			9 794 819,58
	0,8			11 194 079,52
	0,9			12 593 339,46

Av de 390 analysene (30%) med refusjonskategori MG6 er det antatt at $\frac{3}{4}$ er utført som tilpasset NGS analyse med fysisk anriket panel og $\frac{1}{4}$ som målrettet analyse, bioinformatisk filtret eksom.

Av de 715 analysene (55%) med refusjonskategori MG7 er det antatt at $\frac{1}{4}$ er utført som tilpasset NGS analyse med fysisk anriket panel og $\frac{3}{4}$ som målrettet analyse, bioinformatisk filtret eksom. $\frac{1}{4}$ av disse analysene er utført med så stort panel, rundt 1800 gener, at trioanalyse kreves for å få et resultat.

De 65 analysene (5%) med refusjonskategori MG8 og 130 analysene (10%) med refusjonskategori MG7 er alle utført som NGS eksom. Dette er trioanalyser hvor proband, pasienten, omfattes av refusjonskategori MG8 og familiekontrollene, foreldre, omfattes av refusjonskategori MG7.

En prøve kan gjennomgå flere NGS analyser hvor kun en takst utløses. Noen analyse alternativer kan være fysisk anriket panel for forskjellige problemstillinger dekket av panelet, fysisk anriket panel og så eksomanalyse eller filtret eksom og så heleksom analyse. Det antas at dette omhandler 10 - 30% av analysene med beste gjetning 20%. Estimatenes i tabell 12, Sum er gjort pr. analyse.

Antatt refusjonsestimat med korreksjonsfaktor 0,8 for 20% fradrag i estimatet nevnt i Sum og spredning 10 – 30% blir NOK 11 194 079 (9 794 819 - 12 593 339).

6.5 Diagnostisk utbytte

Diagnostisk dypsekvensering har vært benyttet de siste 6-7 år og etter metodeoptimalisering de første årene har laboratorier forskjellige steder i verden rapportert om funnprosent vanligvis i størrelsesorden 25-50% (44).

Ingen annen genetisk test, molekylær, cytogenetisk eller biokjemisk, har tilsvarende funnprosent. Diagnostisk utbytte ved Dypsekvensering er avhengig av klinisk problemstilling.

6.5.1 Preanalytisk optimalisering

Med bakgrunn i lav funnprosent i aldersgruppen over 60 år ble analysetilbudet justert fra mars 2018.

MLPA for påvisning av delesjon eller duplikasjon relatert til CMT/HNPP utføres som tidligere.

Dypsekvensering for påvisning av sekvensvarianter assosiert med perifere nevropatier utføres kun ved sterk mistanke om arvelig perifer nevropati. Analyse av arvelige perifere nevropatier ved høy alder kan være indisert hvis pasienten har slektninger med polyneuropati, har tidligere sykdomsdebut (før ca. 60 år) eller har nevrofysiologiske funn er forenlig med arvelig perifer nevropati samtidig som ikke-genetisk årsak til sykdomsbildet er lite sannsynlig.

Rekvirent mottar begrunnelse for hvorfor Dypsekvensering APN ikke utførtes samt beskjed om at blodprøven lagres og gitt mulighet for å komme med tilleggsopplysninger.

Preanalytisk optimaliserer man dermed sannsynligheten for diagnostisk utbytte ved perifere nevropatier for aldersgruppen over 60 år.

6.5.2 Reanalyse

Ved reanalyse av 4 familier påviste vi funn hos 3 av dem - diagnostisk utbytte 75% (45-48)
Ved sammenligning med observasjonsstudien fra 2015 økte dermed funnprosenten i dette materialet fra 33% (15/46) til 39% (18/46)(2).

6.6 Verdsetting

De helsemessige konsekvensene av dypsekvensering kan være vanskelig å tallfeste ved bruk vanlige mål som f.eks. kvalitetsjusterte leveår. Dette fordi pasientgruppen er svært heterogen og konsekvensene viser stor variasjon. Imidlertid kan dypsekvenseringens konsekvenser beskrives.

Ved sammenligning med andre tilstander og utredning av disse sykdommene er det vist at man ofte ikke kommer til målet før NGS er utført(25). Det er også vist at diagnostiske odysseer kan avsluttes når den genetiske årsak påvises(44). Hos andre pasienter påvises ikke årsak, men det påvises VUS eller tilfeldige funn av betydning for helse.

Sekvensering av cancer genomer har bidratt til bedre å forstå tumorgenese på et molekylærgenetisk nivå, presisjons medisin, med konsekvenser for kreftbehandling, persontilpasset medisin, hvor prediksjon av behandlingsrespons også kan inngå(49). Anvendelsen av NGS teknologien på kreftgenomer har transformert fagfeltet inkludert genetisk og epigenetisk underbygging av sykdomsdebut og progresjon, kreftens terapeutiske sårbarhet og redefinering av paradigmer for diagnoser og behandling(50).

Forskjellige felt av medisinen har blitt påvirket av NGS teknologien slik som kunnskap og forståelse rundt de ikke ervervete epilepsier, mitokondrielle myopatiser og elementer av NGS teknologien har vært benyttet nevrokirurgisk da 2016 WHO klassifikasjon av CNS svulster fordrer molekylær profil for endelig diagnose (51-53). Ofte foreligger ligger det ingen terapi i øyeblikket, men muligheten for tilnærming via presisjons medisin rettet mot påviste *de novo* sekvensvarianter(51-52).

I andre tilfeller, slik som Neuronal ceroid lipofuscinosis (NCL2) og Giant Axonal Neuropathy type 1 (GAN1), kan det foreligge mulighet for terapi dersom sykdommen ikke er kommet for langt eller mulighet for å delta i fase II / fase III studier(54-60). Begge tilstander er neurodegenerative med gradvis tap av ferdigheter, har autosomal recessiv arvegang og debut i barneårene.

NCL2 har mutasjoner i *TPP1* genet, symptomdebut er i 2 - 4 års alder og død inntreffer vanligvis i 10 – 15 års alder, jfr. entry/204500 i OMIM(16).

GAN1 har mutasjoner i *GAN* genet, har symptomdebut i barneårene, er langsomt progressiv og pasienter er ofte pleietrengende fra 15 – 20 års alder, jfr. entry/256850 i OMIM(16).

I enkelte tilfelle er det ikke nødvendig med høyteknologisk eller avansert behandling, men forutsetningen er at man har forstått sykdomsårsaken i tide. Et eksempel er tilstanden Fruktose 1,6-bisfosfat mangel med autosomal recessiv arvegang og mutasjoner i *FBPI* genet, jfr. entry/229700 i OMIM(16). Tilstanden har symptomdebut i nyfødtp perioden eller tidlige barneår. Fruktose 1,6-bisfosfat mangel kan gi hypoglycemi, metabolske forandringer, epileptiske anfall og coma samt hjerneskade og tidlig død. Behandlingen består av kosttiltak også nattestid. Det er særlig viktig å overvåke blodsukkernivå om natten hvor man vanligvis ikke har matinntak og i situasjoner hvor metabolismen er endret slik som under forbigående infeksjoner og dermed kan hjerneskade unngås.

Utsiktede eller tilfeldige eller funn med helsemessige konsekvenser forekommer i under 1% av de foretatte NGS analyser. Anbefalinger for håndtering av tilfeldige funn er foreslått(61). Tilfeldige funn kan eksempelvis være påvisning av sekvensvarianter med økt eller redusert risiko for kreft. Forutsetningen for å tolke sekvensvariantene korrekt er tid og kunnskap(62-64).

Tolkningens kvalitet påvirker verdsettingen av analysen, jfr. artiklene Full strid om mulig kreftgen: - Ny studie kan skade friske kvinner, nr. 296168, og Oslo universitetssykehus får kritikk av fylkesmannen for «medisinsk uforsvarlig» behandling, nr. 261574, i Forskning.no(65).

7 Diskusjon

Fokus har vært på kostnadselementer. Refusjonsberegning er kun gjort for 2018 med takster gjeldende for 2019 da det tidligere ikke fantes takster særskilt tilegnet dypsekvenseringsmetoden. Diagnostisk utbytte og verdsetting er belyst ved eksempler.

7.1 Kostnader

Kostnadselementene knyttet til selve dypsekvenseringsmetoden er forsøkt identifisert og kvantifisert. Andre metoder som er nødvendig for å få et endelig dypsekvenseringsresultat er ikke inkludert. Dette gjelder oftest Sangersekvensering for verifisering av påviste sekvensvarianter. I refusjonskategoriene, jfr. kapittel 3.10 Refusjon, inngår også andre typer analyser i analyseprofilen for den gitte problemstilling slik som MLPA eller ekspansjonsanalyser.

Dermed vil det ikke være samsvar mellom kostnader ved selve dypsekvenseringsmetoden og beløp angitt under de forskjellige refusjonskategorier. Dessuten gjelder Forskrift om godtgjørelse for å yte poliklinisk helsehjelp i spesialisthelsetjenesten (poliklinikkforskriften) for hele landet. Kostnadsnivå kan være forskjellig mellom avdelinger da type utstyr, reagenser og medgått arbeidstid samt administrativ organisering påvirker og definerer de forskjellige elementer.

Kostnader er kun beregnet ut fra lokale forhold. Genomsekvensering er ikke inkludert da vi foreløpig ikke har denne analysen inkludert i vårt repertoar.

Tallverdiene som er benyttet er omtrentlige slik jeg erindrer dem. Dette gjelder utstyrspriser, reagenskostnader, arbeidstidsberegninger, lønnskostnader, prøvevolum og antall prøver i hver refusjonskategori, tabell 3 - 12. Tallverdiene for 2015 er beheftet med noe større grad av usikkerhet enn tallverdiene i 2018 da de ligger lenger tilbake i tid. Hukommelse er en aktiv prosess og erindringsprosessen påvirkes av forskjellige faktorer(66). Imidlertid er tallene for 2015 og 2018 beregnet på samme måte og med samme form for usikkerhet. Dermed får man et inntrykk av utviklingen mellom disse årene.

Tallene er ikke konsumprisindeks (KPI) justert, endringen fra 2015 til 2018 er 8,4%, altså 1000 NOK i 2015 tilsvarte 1084 NOK i 2018(67). De påviste forskjeller i omtrentlige tall mellom 2015 og 2018 blir dermed 3-4% større enn tallverdiene opplyst i tabell 12.

Trenden har vært at prøvevolumet er mer enn tredoblet, tabell 4, mens kostnadsnivået for den enkelte prøve er blitt halvert fra omtrentlig NOK 12 317,42 i 2015 til NOK 6 113,39 i 2018, tabell 12. KPI justert er endringen 54%.

Gjennomsnittskostnadene for dypsekvensering tilpasset med fysisk anriket panel er blitt redusert med 59% fra NOK 10 117,73 i 2015 til NOK 4 135,91 i 2018 og grensekostnadene er redusert med 55% fra NOK 8 297,73 i 2015 til NOK 3 720,52 i 2018. KPI justert er endringen i gjennomsnittskostnad 62% og endringen i grensekostnad er 59%.

Gjennomsnittskostnadene for dypsekvensering filtrert eksom er blitt redusert med 46% fra NOK 12 790,83 i 2015 til NOK 6 970,49 i 2018 og grensekostnadene er redusert med 40% fra NOK 10 970,83 i 2015 til NOK 6 555,11 i 2018. KPI justert er endringen i gjennomsnittskostnad 50% og endringen i grensekostnad er 45%.

Gjennomsnittskostnadene for dypsekvensering heleksom er blitt redusert med 60% fra NOK 19 779,63 i 2015 til NOK 7 870,49 i 2018 og grensekostnadene er redusert med 58% fra NOK 17 959,63 i 2015 til NOK 7 455,11 i 2018. KPI justert er endringen i gjennomsnittskostnad 63% og endringen i grensekostnad er 62%.

Reduksjonen i utstyrskostnader pr. prøve skyldes i all hovedsak det økte prøveantall.

Reduksjonen i laboratoriekostnader pr. prøve skyldes i all hovedsak utstyrendringen da reagenskostnadene for Illumina NextSeqTM500 er lavere enn de var for Illumina HiScanSQ. Valutakursendringen for USD har vært minimal, 0,9%, fra 2015 til 2018, fra 1 USD = 8,0640 NOK i 2015 til 8,1351 i 2018.

Reduksjonen i arbeidskostnader pr. prøve skyldes i all hovedsak mer effektivt tolkningsarbeid, jfr. tabell 10-12. Årsaken til det reduserte tolkningsarbeid er ACMG retningslinjene publisert i mars 2015, revisjoner av disse retningslinjer, økt bioinformatisk kompetanse og tilgang til gradvis større frekvensdatabaser over antatt normale sekvensvarianter som gnomAD (31-33).

I Nasjonal strategi for persontilpasset medisin i helsetjenesten 2017 - 2021 framkommer satsingen på storskalasekvensering og behov for nasjonale databaser er nevnt, jfr. Helsedirektoratets publikasjonsnummer: IS-2446(68). I Prop. 1 S (2018–2019) for budsjettåret 2019, Helse- og omsorgsdepartementet, Regjeringen.no. kap 2.27 Persontilpasset medisin er følgende nevnt(69):

Det foreslås 6 mill. kroner til oppfølging av tiltak i Nasjonal strategi for persontilpasset medisin (2017–2021), med en samlet bevilgning på vel 25,7 mill. kroner i 2019. Styrkingen skal gå til oppbygging og drift av en nasjonal, anonymisert database over genetiske varianter hos norske pasienter og til et nasjonalt kompetansenettverk for persontilpasset medisin.

Satsingen på storskalasekvensering / NGS /dypsekvensering har nasjonale konsekvenser og økonomiske konsekvenser utenfor det enkelte helseforetak.

Når det gjelder analysetype, har det vært et trendsifte fra 2015 til 2018, tabell 4. Mine estimater er at dypsekvensering tilpasset med fysisk anriket panel, utgjorde i 2015 70% av analysene og i 2018 utgjorde denne analysetypen 30%. Dypsekvensering filtrert eksom utgjorde i 2015 10% av analysene og i 2018 utgjorde denne analysetypen 50%. De første filtrerte eksomer var utført i 2015. Dypsekvensering heleksom utgjorde i 2015 20% av analysene og i 2018 utgjorde denne analysetypen 15%.

7.2 Refusjon

De historiske medisinsk genetiske laborietakster var ikke tilpasset NGS. Tidligere ble takstsystemet benyttet forskjellig, det var individuelle forskjeller mellom avdelinger og NGS var innbakt i øvrig refusjon.

I 2017 / 2018 skjedde en harmonisering og endring etter dialog mellom myndigheter og medisinsk genetiske avdelinger og genetisk miljø. Omleggingen skulle skje budsjettneutralt på nasjonalt nivå i 2018 og refusjonsordningen skal være aktivitetsbasert(37). I tillegg har omregningsfaktoren som blir benyttet i avregningen mellom Helseforetak blitt betraktelig redusert, harmonisert og gjort lik. Omregningsfaktoren skal nå være 1,8 i henhold til muntlig lokalt mottatte opplysninger.

Jeg har i de videre beregninger under Resultat valgt å benytte koder gjeldende for 2019 da det for tidligere år ikke var publisert tilsvarende refusjonsdetaljer for storskalasekvensering.

Refusjonsbeløpene som er angitt inkluderer også andre metoder nødvendig for å kunne utferdige et svar. Kun kostnadsberegning for dypsekvenseringsmetoden er utført. Dermed vil det ikke være en balanse eller samsvar mellom kostnads- og refusjonsestimater. Dessuten kan det forekomme kostnadsforskjeller mellom medisinsk genetiske avdelinger og omleggingen til nytt takstsystem skulle skje budsjettneutralt på nasjonalt nivå, ikke på lokalt nivå.

7.3 Diagnostisk utbytte

Viktige faktorer for å oppnå et diagnostisk utbytte av NGS analysen er kvalitet, kompetanse og nok tid i alle ledd. Metoden dekker først og fremst et behov innenfor spesialisthelsetjenesten. Et positivt resultat forutsetter også at rett pasient er undersøkt og ikke en pasient med en fenokopi av den genetiske tilstanden(70).

Hvis rekvirentprofilen endres eksempelvis mer i retning av primærhelsetjenesten, vil ascertainment av pasienter påvirkes med konsekvenser for diagnostisk utbytte, funnprosent(71,72).

Hvordan NGS analysen benyttes, rekvirentens motiv, - for påvisning eller for eksklusjon av en genetisk diagnose - har også betydning for funnprosent. Funnprosent kan dermed endre seg over tid selv med samme rekvirent da det kan være forskjellige pasientgrupper med samme kliniske problemstilling / diagnose som undersøkes.

Antall gener som undersøkes ved forskjellige problemstillinger som arvelig nevropati har vært økende grunnet ny kunnskap. Arbeidsmengden pr. prøve og muligheten for funn har økt med tiden. Samtidig har antagelig rekvirenters holdning og bruk av tilpassede genpanel endret seg. I den første fasen hvor NGS var en ny diagnostisk metode er det rimelig å anta at det ble rekvirert genetisk undersøkelse av pasienter med forholdsvis sikker diagnose basert på sykehistorie, kliniske funn og familiehistorie. Etter hvert har rekvirentene blitt mer vant til analyserepertoaret slik at analysene nok også til dels benyttes med annen hensikt, i eksklusjonsøyemed, og følgelig med påvirkning av funnprosent. Alder er en faktor som preanalytisk benyttes for å øke diagnostisk utbytte siden funnprosenten synker med stigende alder ved symptomdebut.

Ved NGS eksom har ny kunnskap, frekvensdatabaser og bioinformatiske verktøy økt det diagnostiske utbytte. Dette belyses ved økning i funnprosent i tidligere publisert materiale ved reanalyse av tidligere prøver uten funn.

7.4 Verdsetting

NGS analysen kan ha betydning for den enkelte pasient og familie da man ikke eier sin arvemasse, men deler den med sine slektninger. Et resultat kan dermed ha betydning for flere og ha etiske implikasjoner. Ved trioanalyse undersøkes flere personer for å få et resultat hos en, proband.

Tilfeldige funn med betydning for helse kan også forekomme, er i størrelsesorden under 1% prosent av de undersøkte, og anbefalinger for håndtering av tilfeldige funn er foreslått(61).

En NGS analyse har betydning for den enkelte pasients situasjon både ved påvist og ikke påvist sekvensvariant av betydning. Sekvensvarianten kan ha betydning for diagnose, videre håndtering i helsevesenet og av og til for behandling (16,54-60).

NGS analyser har bidratt til ny kunnskap og paradigmeskifter innenfor flere medisinske fagfelt(25,44,49-53).

Tolkningen av NGS analysene har også bidratt til kunnskap og erfaring lokalt. Kunnskap og erfaring er av betydning for håndtering av senere pasienter. Resultatet er illustrert kun ved egne internasjonale presentasjoner, 35, og vitenskapelige publikasjoner, 7, for de siste 5 år hvor NGS har vært av betydning(1,2,32,45,48,73,74).

8 Konklusjon

Dypsekvenseringsmetodens kostnadselementer har vært identifisert og kvantifisert med omtrentlige nominelle tall for 2015 og 2018 slik at en sammenligning kunne foretas. I samsvar med internasjonale data, figur 1 og 2, har metodens kostnader blitt redusert fra 2015. Tolkingsarbeidet er effektivisert hovedsakelig grunnet retningslinjer for tolkning, og frekvensdatabaser over antatt normale sekvensvarianter.

Kostnadsendringen i løpet av de siste tre år begrunner også fremtidige kostnadsvurderinger for storskalasekvensering. Det gjelder å oppnå mest mulig helse for hver krone.

Mitt fokus har vært på kostnadselementene. De helsemessige konsekvensene av dypsekvensering kan være vanskelig å tallfeste ved bruk vanlige mål som f.eks. kvalitetsjusterte leveår. Dette fordi pasientgruppen er svært heterogen og konsekvensene viser stor variasjon. Imidlertid kan dypsekvenseringens konsekvenser beskrives hvor ny kunnskap også er dokumentet.

Hvis man skal benytte et vanlige mål, f. eks. kvalitetsjusterte leveår, må man følge pasientforløp og kostnader for enkeltsykdommer da NGS funnprosent og oppfølging varierer med sykdomsgruppe eller type genetisk sykdom. Effektmålene må også være tilstrekkelig kvalitetssikret og mulige å måle. I fremtiden bør slike analyser være gjennomførbare innenfor etiske standarder, datatilsyn og personvernsregler, GDPR.

Etablering av nasjonale sekvensdatabaser kan bidra i tolkningsarbeidet. Vesentlig er også tilgang til internasjonale databaser over normalvariasjon. Falske positive funn også i mutasjonsdatabaser har hele tiden vært et tolkningsproblem(75-77).

Kvalitet og størrelse på mutasjonsdatabaser og sekvensvariantdatabaser over friske individer er en forutsetning for en mulig fremtidig automatisering av sekvensvariant tolkningen.

Hvis prosessen automatiseres i fremtiden, vil tidsbruk bli redusert og resultatene kan få umiddelbare konsekvenser f.eks. under forskjellige former for kreftoperasjoner og andre inngrep. Resultatene er umiddelbart til stede, biologiske drivere for sykdomsprosess kan identifiseres med et persontilpasset terapivalg enten operativt eller medikamentelt. Ved denne

type kreftbehandling vil det være nødvendig at data om legemidler kobles inn i Kreftregisteret.

En annen fremtidig antagelse man kan gjøre med ny kunnskap er at biologiske drivere for tilheling og modellering av f.eks. brudd blir kjent, disse kan aktiviseres lokalt med konsekvenser for behandlingstid og rehabiliteringsprosess. Tilsvarende kan man tenke at en kan få nye behandlingsmuligheter for andre tilstander som ryggmargsskade eller traumatiske amputasjoner av ben eller armer, og antagelig da kombinert med aktivering av pluripotente stamceller. Imidlertid er dette fremtidsvyer.

I dag kan kunnskap om sykdommer og sekvensvarianter noen ganger benyttes til høyteknologisk behandling, til kontroll av sykdomsforløp eller forebygge sykdomsutvikling.

Denne mastergraden beskriver et øyeblikksbilde. Utstyr, kostnader, kapasitet, diagnostisk utbytte er i vedvarende utvikling. Metoden blir gradvis enklere å benytte selv om den fortsatt er høyspesialisert og krever særskilt kompetanse.

Denne mastergraden kan være et nyttig utgangspunkt, rammeverk og fundament for mer detaljerte fremtidige økonomiske analyser rundt storskalsekvensering.

9 Litteraturliste

1. Høyer H, Busk ØL, Holla ØL, Strand L, Russell MB, Skjelbred CF, et al. Hereditary peripheral neuropathies diagnosed by next-generation sequencing. *Tidsskr Nor Laegeforen*. 2015;135(20):1838-44.
2. Holla ØL, Busk ØL, Tveten K, Hilmarsen HT, Strand L, Høyer H, et al. Clinical exome sequencing – Norwegian findings. *Tidsskr Nor Laegeforen*. 2015;135(20):1833-7.
3. Store norske leksikon. <https://snl.no> (vist 21/02/2019).
4. Store medisinske leksikon. <https://sml.snl.no/> (vist 21/02/2019).
5. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. *Thompson & Thompson Genetics in Medicine*. 6 ed. Philadelphia, Pennsylvania: WB Saunders Company; 2001.
6. Darwin C. *The Origin of Species*. London, United Kingdom: CRW Publishing Limited; 2004. ISBN 9781904633785
7. Vogel F, Motulsky A. *Human Genetics*. 3 ed. Berlin Heidelberg Germany: Springer Verlag; 1996.
8. Dahm R. Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. *Hum Genet*. 2008;122(6):565-81.
9. Avery OT, MacLeod CM, McCarty M. Studies of the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* Type III. *J Exp Med*. 1944; 79:137–158.
10. Chargaff E, Magasinik B, Doniger R, Vischer E. The nucleotide composition of ribonucleic acids. *J Am Chem Soc*. 1949;71(4):1513.
11. Chargaff E. Structure and function of nucleic acids as cell constituents. *Fed Proc*. 1951;10(3):654-9.
12. Hershey AD, Chase M. Independent functions of viral proteins and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J Gen Physiol*. 1952;36:39–56.
13. Watson JD, Crick FH. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature*. 1953;171:964–967.
14. Berg K. The Year's Nobel Prizes in physiology and medicine. *Tidsskr Nor Laegeforen*. 1968;88(22):2135-7.
15. Universitetet i Bergen. <https://org.uib.no/gensidene/genkode> (vist 19/02/2019).

16. Online Mendelian Inheritance in Man. <https://www.omim.org/> (vist 20/02/2019).
17. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.* 1975;94(3):441-8.
18. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977;74(12):5463-7.
19. Human Genome Organisation (HUGO). (<http://www.hugo-international.org/> (vist 05/04/2019)).
20. Ernster L, Schatz G. Mitochondria: a historical review. *J Cell Biol.* 1981;91(3 Pt 2):227s-255s.
21. Human Genome Project (HGP). (<https://www.genome.gov/10001772/all-about-the--human-genome-project-hgp/> (vist 05/04/2019)).
22. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001;409(6822):860-921.
23. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science.* 2001;291(5507):1304-51.
24. Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed.* 2013;98(6):236-8.
25. Neveling K, Feenstra I, Gilissen C, Hoefsloot LH, Kamsteeg EJ, Mensenkamp AR, et al. A post-hoc comparison of the utility of sanger sequencing and exome sequencing for the diagnosis of heterogeneous diseases. *Hum Mutat.* 2013;34(12):1721-6.
26. Wetterstrand KA. DNA Sequencing Costs: Data from the NHGRI Genome Sequencing Program (GSP). www.genome.gov/sequencingcostsdata (vist 19/04/2019).
27. Belkadi A, Bolze A, Itan Y, Cobat A, Vincent QB, Antipenko A, et al. Whole-genome sequencing is more powerful than whole-exome sequencing for detecting exome variants. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015;112(17):5473-8.
28. Mackley MP, Blair E, Parker M, Taylor JC, Watkins H, Ormondroyd E. Views of rare disease participants in a UK whole-genome sequencing study towards secondary findings: a qualitative study. *Eur J Hum Genet.* 2018;26(5):652-659.
29. Ng SB, Turner EH, Robertson PD, Flygare SD, Bigham AW, Lee C, et al. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature.* 2009;461(7261):272-6.

30. Isakov O, Perrone M, Shomron N. Exome sequencing analysis: a guide to disease variant detection. *Methods Mol Biol.* 2013;1038:137-58.
31. Richards CS, Bale S, Bellissimo DB, Das S, Grody WW, Hegde MR et al. ACMG recommendations for standards for interpretation and reporting of sequence variations: Revisions 2007. *Genet Med.* 2008;10(4):294-300.
32. Høyer H, Braathen GJ, Busk ØL, Holla ØL, Svendsen M, Hilmarsen HT, et al. Genetic diagnosis of Charcot-Marie-Tooth disease in a population by next-generation sequencing. *Biomed Res Int.* 2014;2014:210401.
33. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405-24.
34. Lovdata, forskrifter. https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2007-12-19-1761?q=forskrifter+utgifter+helsehjelp+poliklinisk#KAPITTEL_4 (vist 03/04/2019).
35. Norsk laboratoriekodeverk (NLK) (<https://ehelse.no/standarder-kodeverk-og-referanse katalog/standarder-og-referanse katalog/nlk-norsk-laboratoriekodeverk>) (vist 03/04/2019).
36. Helfo, regelverk. <https://helfo.no/takster/regelverk-og-refusjon-for-sjukehus-og-poliklinikk>
37. Helfo, finansieringsordning. <https://helfo.no/Documents/Sykehus%20og%20poliklinikk/Finansieringsordning-polikliniske%20laboratorieanalyser-statlige%20helseinstitusjoner-regler-fremsettelse-refusjonskrav%202018.pdf> (vist 03/04/2019).
38. Den norske Bank, valutakurser. (<https://www.dnb.no/bedrift/markets/valuta-renter/valutakurser-og-renter/>) (vist 02/04/2019).
39. Helsedirektoratet. <https://helsedirektoratet.no/autorisasjon-utdanning-og-godkjenning/spesialistutdanning-og-spesialistgodkjenning/lege/medisinsk-genetikk#søknadsskjema-og--veiledning> (vist 23/03/2019).
40. Lovdata, Lov om humanmedisinsk bruk av bioteknologi m.m. (bioteknologiloven). <https://lovdata.no/dokument/NL/lov/2003-12-05-100?q=bioteknologiloven> (vist 23/03/2019).

41. Den norske legeforening, Avtaler (<https://legeforeningen.no/Emner/Andre-emner/Avtaler/Avtalearkiv/Spekter/Minimunslonn-Spekter/Gamle-avtaler-og-oppgjor1/>) (vist 21/04/2019).
42. Braathen GJ, Sand JC, Lobato A, Høyer H, Russell MB. Genetic epidemiology of Charcot-Marie-Tooth in the general population. *Eur J Neurol.* 2011;18(1):39-48.
43. Illumina, gamle priser. http://mkt.illumina.com/rs/illumina/images/2015%20AMR-USD.pdf?mkt_tok=3RkMMJWWf9wsRonuqTLe%2B%2FhmjTEU5z16esuXqSyh4kz2EFye%2BLIHETpodcMRcNkMK%2BTFAwTG5toziV8R7bFLM14380QUhPI (vist 02/05/2019).
44. Grody WW. The transformation of medical genetics by clinical genomics: hubris meets humility. *Genet Med.* 2019 Mar 7. doi: 10.1038/s41436-019-0450-0.
45. Küry S, van Woerden GM, Besnard T, Proietti Onori M, Latypova X, Towne MC, et al. De Novo Mutations in Protein Kinase Genes CAMK2A and CAMK2B Cause Intellectual Disability. *Am J Hum Genet.* 2017;101(5):768-788.
46. Braathen GJ, Bryne E, Busk ØL, Tveten K, Holla ØL. A novel DHX30 variant identified in a Norwegian girl with neurodevelopmental disorder. *Accepted.* 5th Congress of the European Academy of Neurology (EAN) Oslo, Norway, June 29 – July 2, 2019.
47. Braathen GJ, Dulovic-Mahlow M, Trinh J, Kandaswamy KK, Werber M, Krajka V, et al. De novo mutations in TAOK1 cause neurodevelopmental disorders. *Accepted.* 5th Congress of the European Academy of Neurology (EAN) Oslo, Norway, June 29 – July 2, 2019.
48. Dulovic-Mahlow M, Trinh J, Kandaswamy KK, Braathen GJ, Di Donato N, Rahikkala E, et al. De novo variants in TAOK1 cause neurodevelopmental disorders. *Am J Hum Genet.* *Accepted.*
49. Morganti S, Tarantino P, Ferraro E, D'Amico P, Viale G, Trapani D, et al. Complexity of genome sequencing and reporting: Next generation sequencing (NGS) technologies and implementation of precision medicine in real life. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2019;133:171-182.
50. Mardis ER. The Impact of Next-Generation Sequencing on Cancer Genomics: From Discovery to Clinic. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018 Nov 5. pii: a036269.

51. Møller RS, Hammer TB, Rubboli G, Lemke JR, Johannesen KM. From next-generation sequencing to targeted treatment of non-acquired epilepsies. *Expert Rev Mol Diagn.* 2019;19(3):217-228.
52. Ahmed ST, Craven L, Russell OM, Turnbull DM, Vincent AE. Diagnosis and Treatment of Mitochondrial Myopathies. *Neurotherapeutics.* 2018;15(4):943-953.
53. Patel A, Belykh E, Miller EJ, George LL, Martirosyan NL, Byvaltsev VA, et al. MinION rapid sequencing: Review of potential applications in neurosurgery. *Surg Neurol Int.* 2018;9:157.
54. Braathen GJ, Slinde S, Busk ØL, Tveten K, Holla ØL, Hilmarsen HT, Helle JR. Diagnosing Neuronal ceroid lipofuscinosis with Next-generation sequencing, an example. *Eur J Hum Genet* 2016; 24 (E-Suppl. 1): P09.105, 203. European Society of Human Genetics Conference, Barcelona, Spain, May 21-24, 2016.
55. Braathen GJ, Mork M, Tveten K, Holla ØL, Busk ØL, Svendsen M, Høyer H. Giant axonal neuropathy diagnosed with Next-generation sequencing technology. *Eur J Neurol* 2017; 24 (Suppl. S1): EP1210, 229. 3rd Congress of the European Academy of Neurology (EAN) Amsterdam, The Netherlands, June 24 - 27, 2017.
56. Biomarin Pharmaceutical Inc. <https://www.brineura.com/> (vist 28/04/2019).
57. Medscape. <https://emedicine.medscape.com/article/1178391-treatment> (vist 28/04/2019).
58. Hanna's Hope Fund © 2009 – 2019. <http://www.hannahshopefund.org/> (vist 28/04/2019).
59. ClinicalTrials.gov, NIH National Library of Medicine. Intrathecal Administration of scAAV9/JeT-GAN for the Treatment of Giant Axonal Neuropathy. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02362438?term=giant+axonal+neuropathy&rank=1> (vist 28/04/2019).
60. ClinicalTrials.gov, NIH National Library of Medicine. Giant Axonal Neuropathy Natural History Study. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01503125?term=giant+axonal+neuropathy&rank=2> (vist 28/04/2019).
61. Hehir-Kwa JY, Claustres M, Hastings RJ, van Ravenswaaij-Arts C, Christenhusz G, Genuardi M, et al. Towards a European consensus for reporting incidental findings during clinical NGS testing. *Eur J Hum Genet.* 2015;23(12):1601-6.

62. Møller P, Hovig E. The BRCA2 variant c.68-7 T>A is associated with breast cancer. *Hered Cancer Clin Pract.* 2017;15:20.
63. Colombo M, Lòpez-Perolio I, Meeks HD, Caleca L, Parsons MT, Li H, et al. The BRCA2 c.68-7T > A variant is not pathogenic: A model for clinical calibration of spliceogenicity. *Hum Mutat.* 2018;39(5):729-741.
64. Møller P, Hovig E. Retraction Note to: The BRCA2 variant c.68-7 T > A is associated with breast cancer. *Hered Cancer Clin Pract.* 2018;16:10.
65. Forskning.no. <https://forskning.no> (vist 28/04/2019).
66. Myhrer TG. Johs. Andenæs Norsk strafferett. 2009, 4. utgave. Universitetsforlaget. Oslo. Kap.23 Vitnebeviset side 175-176.
67. Statistisk sentralbyrå, Konsumprisindeks. <https://www.ssb.no/kpi> (vist 04/05/2019).
68. Helsedirektoratet. Nasjonal strategi for persontilpasset medisin i helsetjenesten, IS-2446 www.helsedirektoratet.no
69. Regjeringen.no, Prop. 1 S (2018–2019) for budsjettåret 2019. <https://www.regjeringen.no/no/dokumenter/prop.-1-s-20182019/id2613728/sec1> (vist 05/05/2019).
70. Braathen GJ, Sand JC, Russell MB. Symptomatic Charcot-Marie-Tooth? A pair of concordant monozygotic twins. *Acta Neurol Scand.* 2006;114(6):403-6.
71. Berkson J. Limitations of the application of fourfold table analysis to hospital data. *Biometrics.* 1946;2(3):47-53.
72. Sackett DL. Bias in analytic research. *J Chronic Dis.* 1979;32(1-2):51-63.
73. Braathen GJ, Høyer H, Busk ØL, Tveten K, Skjelbred CF, Russell MB. Variants in the genes DCTN2, DNAH10, LRIG3, and MYO1A are associated with intermediate Charcot-Marie-Tooth disease in a Norwegian family. *Acta Neurol Scand.* 2016;134(1):67-75.
74. Arntzen KA, Høyer H, Ørstavik K, Tallaksen C, Vedeler C, Østern R, et al. Charcot-Marie-Tooth disease type 4C in Norway: Clinical characteristics, mutation spectrum and minimum prevalence. *Neuromuscul Disord.* 2018;28(8):639-645.
75. LeDoux MS. Exome sequencing for gene discovery: time does not stand still. *Ann Neurol.* 2012;72(4):628-9.
76. Goldfeder RL, Priest JR, Zook JM, Grove ME, Waggott D, Wheeler MT, et al. Medical implications of technical accuracy in genome sequencing. *Genome Med.* 2016;8(1):24. doi: 10.1186/s13073-016-0269-0.

77. Yang Z, Sun G. High-frequency, low-coverage "false positives" mutations may be true in GS Junior sequencing studies. *Sci Rep.* 2017;7(1):13751. doi: 10.1038/s41598-017-13116-6.