DNA míting na ktorom som sa zúčastnil, bol na vysokej úrovni a prezentuje rýchlosť, s akou v súčasnosti molekulárna genetika napreduje. Na základe nadobudnutých poznatkov, by som navrhoval naplánovať kúpu NGS sekvenátora aspoň na jedno z našich pracovísk. Dnes už je možné konštatovať, že NGS postupne vytlačia doteraz používané sekvenátory na fragmentačnú analýzu. Podľa prezentovaných výsledkov forénznych laboratórií sa momentálne najlepšie výsledku dosahujú na prístroji MiSeq FGX a Ion Torrent.

Ďalej by som chcel poukázať na skutočnosť, že na našich pracoviskách vôbec nevyužívame potenciál informácií, ktorý sme analýzou Y chromozómu schopný získať. Ide najmä o zistenie haploskupiny pôvodcu a prípadne geografické nasmerovanie pôvodcu stopy. Zadaním Y haplotypu do jednej z voľne prístupných databáz na internete, je možné pri neobjasnenom závažnom trestnom čine jednoducho zistiť haploskupinu a poskytnúť vyšetrovateľovi dôležitú informáciu o populácii, do ktorej by páchateľ mohol s určitou pravdepodobnosťou patriť (ázijské, africké, európske, rómske populácie atď.). Následnou analýzou SNP pomocou NGS sekvenátora, by bolo možné stanoviť presnejšiu subpopuláciu a ak by u nás existovala aj Y databáza týchto profilov, bolo by možné odhadnúť aj geografický pôvod páchateľa.

Na záver by som chcel poukázať na fakt, že v našich laboratóriách stále nie je rozbehnutá mitochondriálna DNA, aj keď takmer vo všetkých vyspelých laboratóriách už roky funguje. Jej význam je najmä u vzoriek, kde nie je možné najmä z dôvodu degradácie získať úplný profil z autozomálnej DNA.

V nasledujúcich bodoch uvádzam stručné zhrnutie prezentovaných prednášok:

**NGS**

* problémy:  - homopolyméry (strata alel – napr. Penta E)
* stále drahé (800 eur na run, 20 vz. v rane) ale cena klesá
* Identifikácia jednovaječných dvojčiat na základe zriedkavých mutácií - 5 single SNP (3 z 1000 narodení sú dvojičky, 83 % šanca že je zmena v genóme),
* identifikácia pôvodu tkanív a telových tekutín (Ion Torrent PGM),
* ohodnotenie NGS v FBI lab. – vyššia kvantita a diskriminačná sila genetických dát, veľké DNA fragmenty (viac ako 1 kb) získané zo vzoriek s nízkou kvalitou/kvantitou,
* identifikácia degradovaných, inhibovaných vzoriek,
* zmiešané vzorky – presnejší výstup, jasné alely minoritného prispievateľa (SNPs),
* NGS schopný osekvenovať celý ľudský genóm za 1 deň,
* komplexnejší výstup pri paternitných testovaniach,
* možnosť odhaliť biogeografický pôvod vzoriek a fenotypový prejav pôvodcu vzorky – dôležitá informácia pre vyšetrovateľa,
* využitie SNPs v NGS – vyššia diskriminačná sila ako klasické STR kity,
* QIAGEN vyvinul GeneRead postup pre NGS,
* identifikácia vývinových štádií hmyzu za účelom zistenia post-mortem intervalu (forenz.entomológia) + forénzna botanika,
* maximálne množstvo informácií z jednej vzorky (veľké množstvo STR a SNP markerov v jednej „reakcii“),
* vhodnejší na analýzu mtDNA ako kapilárna elektroforéza (vyšší výťažok, presnejší),
* **MiSeq FGx system** (illumina) – vyvinuli systémy: Global Autosomal STR, Global Y STR, Identity SNPs, Phonotypic SNPs, Ancestry SNPs, X-STR,
* cca 200 markerov, optimálne množstvo DNA = 1 ng, (aj 50-100 pg), 1-96 vzoriek,
* pripravuje sa kombinácia RNA a DNA analýza vzorky v jednom protokole,
* pripravuje sa jeden kit so všetkými doteraz používanými STR systémami,
* taliani – štúdia degradovaných vzoriek na NGS, - ľahko degradované – lepšie ako CE, silno degradované – nevhodné,

**Y chromozóm**

* využitie NGS pri paternitných štúdiách, 550 Y-SNPs , IonTorrent PGM
* Y filer Plus (Life Technologies) – kit s 27 Y STR markermi,
* update YHRD Y databázy, rozšírená o nové markery, namiesto manuálneho vkladania sa bude dať importovať haplotyp v rôznych formátoch, od 1.6.
* V súčasnosti sa vyvíjajú softvéry na štatistické hodnotenie Y – STR markerov (YHRD) a mtDNA (EMPOP), výpočet LR, potrebná štandardizácia, problém – malé databázy,
* UK – vyhodnotenie kritérií odberu vzoriek pri znásilneniach: potrebné vaginálne (vnútorné, vonkajšie) a análne stery, vzorky odobrať do 48 hod. od znásilnenia, poškodená by nemala mať sex 10 dní pred činom, ak nebola mikroskopicky dokázaná prítomnosť spermy, aj tak by mala byť vykonaná diferenciálna extrakcia „spermy“,
* DK – analýza Y-STR dát pomocou Laplace modelu,
* haplogrup predictor ([www.hprg.com/hapest5](http://www.hprg.com/hapest5)) – možnosť zistenia, do ktorej haploskupiny určitý haplotyp patrí, možnosť určenia podskupín pomocou SNPs,
* PL- výskum mutácií na Y chromozóme
  + ohodnotenie mutačného pomeru Y-STR: pre Yfiler na 17 lokusoch 27 mutácií (7%), PPY 23 na 23 lokusoch 44 mutácií (11,4%),
  + 13 RM Y-STR markerov – štúdia 361 Y-STR otcov a ich synov = 58 mutácií, najčastejšia na DYS518
* Stanovenie Y-STR plodu neinvazívnou metódou z buniek placenty, na 12 týždeň od počatia = zistenie, či otec je biologickým otcom dieťaťa,
* stanovenie markerov na zistenie veku v telových tekutinách (Kórea) na základe DNA metylácie (6 CpG markerov) – rozdiel v rozmedzí 3,5 až 6,4 rokov,

**mtDNA**

* pomocou NGS je možné osekvenovať celý mt genóm aj degradovaných vzoriek,
* populačné štúdie : Portugalsko, Východné Timory, Grónsko, skoré Alpské populácie,
* mitochondriálna geteroplazmia v rôznych tkanivách (až u 88% jedincov),
* mtDNA vo vlasoch – zníženie kvantity smerom od korienka ku špičke, heteroplazmia,
* sterilizácia eppendorfiek, špičiek, odberových tyčiniek etylén oxidom – zdravotne škodlivý a deštruuje stopové množstvá DNA, nahradzuje sa hydrogén-peroxid plazmovou sterilizáciou,
* mtDNA z vysoko degradovaných vzoriek pomocou NGS, (ľudské pozostatky z 2.svetovej vojny a z archeologických vykopávok),
* vyhodnotenie výsledkov medzilaboratórneho cvičenia na stanovenie DNA profilu z kostí (600 a 100 ročných),