

<b>Ref. Doc.:</b> Recomendaciones Comisión GHEPMIX	<b>Edición:</b> 01	<b>Fecha:</b> 28 de junio de 2012	<b>Páginas Totales:</b> 25
<b>Criterios mínimos recomendados para la Aceptación y Evaluación de Perfiles Mezclas</b>			

### Autores:

Manuel Crespillo<sup>1</sup>

[manuel.crespillo@mju.es](mailto:manuel.crespillo@mju.es)

Juan Antonio Luque<sup>1</sup>

[juan.luque@mju.es](mailto:juan.luque@mju.es)

Miguel Rafael Paredes<sup>1</sup>

[miguel.paredes@mju.es](mailto:miguel.paredes@mju.es)

Pedro A. Barrio<sup>1</sup>

[pedroalberto.barrio@mju.es](mailto:pedroalberto.barrio@mju.es)

**Nota aclaratoria sobre el documento:** Se entiende que existe multitud de enfoques en la “interpretación de mezclas”, y que cada caso que se da en la casuística diaria es diferente. Muestra de ello es la multitud de bibliografía existente al respecto (revisar “referencias” al final del documento). Teniendo en cuenta esto, los autores quieren manifestar que:

- El presente documento ha sido elaborado por la *Comisión de Mezclas del GHEP-ISFG*, tras la valoración de los ejercicios colaborativos sobre mezcla (GHEPMIX) y la validación interna desarrollada para este tipo de perfiles, como se comentará más adelante.
- Este documento recoge exclusivamente la opinión personal de los autores del mismo. Por tanto, no puede ser entendido como unas recomendaciones oficiales emitidas por el *GHEP-ISFG*, sino sencillamente como un documento guía, de carácter consultivo, generado por esta *Comisión de Mezclas del GHEP-ISFG*.

### Objetivo:

La interpretación y valoración de los perfiles mezcla (STRs autosómicos) es sin duda alguna una de las principales dificultades con las que los laboratorios forenses se encuentran en su quehacer diario. Numerosos grupos de trabajo científicos han editado recomendaciones y guías para abordar el análisis y valoración de este tipo de perfiles (Clayton et al., 1998; Gill et al., 2006; Gill et al., 2008; Schneider et al., 2009; Stringer et al., 2009; Budowle y cols., 2009; Meulenbroek et al., 2011; Benschop et al., 2012). Sin embargo, a pesar de ellas, la dificultad interpretativa y la falta de un criterio único constituyen importantes retos con los que los laboratorios se enfrentan.

Con el presente documento se pretende ofrecer una guía para que los laboratorios integrantes del GHEP-ISFG puedan emplearlo en su labor diaria. No pretende por tanto dar “formulas mágicas” sino poner sobre la mesa la problemática que se plantea y posibles herramientas de solución que los laboratorios deben desarrollar.

Este documento está basado en la literatura científica existente al respecto, y en los procesos de validación llevados a cabo en algunos de los laboratorios que componen el GHEP-ISFG, así como en las conclusiones extraídas a partir de los ejercicios interlaboratorio organizados por el propio GHEP-ISFG [ejercicios para la interpretación de mezclas de perfiles STRs autosómicos, *GHEPMIX1(2009)*, *GHEPMIX2(2010)* y *GHEPMIX3(2011)*] y del *I Workshop* sobre “Interpretación de mezclas de perfiles STRs autosómicos”.

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. Departamento de Barcelona. C/ La Mercé, 1 – 08002 Barcelona. Tel.: +34 93 3174061 / Fax: +34 93 3182530

<b>Ref. Doc.:</b> Recomendaciones Comisión GHEPMIX	<b>Edición:</b> 01	<b>Páginas:</b> 1 de 25
--	--------------------	-------------------------

## Introducción y presentación del problema:

El avance tecnológico llevado a cabo en torno a la PCR (con el desarrollo de *kits* comerciales cada vez más sensibles), así como en los sistemas de detección de fragmentos mediante secuenciadores automáticos, ha permitido incrementar el grado de sensibilidad, lo que permite valorar mezclas más complejas (no equilibradas y con alguno de sus componentes en estado minoritario).

Tal y como se mencionaba anteriormente, ante la imposibilidad de establecer una estrategia única de interpretación de perfiles mezcla, sí se hace necesario fijar unos criterios como requisitos mínimos para su interpretación. Estos han de constituir los **criterios únicos** dentro de un mismo laboratorio; han de ser **objetivos**, es decir, han de estar basados en una validación interna dentro del propio laboratorio; se han de definir unos **límites de calidad** en la aceptación de perfiles mezclas; y en definitiva, han de suponer una **estandarización**, en la medida de lo posible, entre laboratorios, fundamentalmente de cara a la presentación de los resultados en las vistas orales de los juicios, o para una eventual introducción del perfil mezcla en base de datos.

De este modo, como se ha detallado en el párrafo anterior, en base a los requisitos mínimos que se pretenden establecer con el presente documento, cada laboratorio debería determinar, según la validación interna, una serie de parámetros que permitan tomar decisiones en la interpretación de perfiles mezcla. En cualquier caso, se ha de insistir en la importancia de llevar a cabo dicha validación interna, y que constituirá un bloque importante del presente documento.

Sirviendo como guía para interpretar los perfiles mezclas la propuesta publicada por Clayton y colaboradores (1998), se proponen los siguientes pasos:

1. Asignación de alelos, para la cual se deberán de emplear los umbrales establecidos por cada laboratorio, mediante una validación interna.
2. Confirmación de un perfil mezcla, a través del establecimiento de parámetros / umbrales, determinados también mediante una validación interna.
3. Estima del número de contribuyentes.
4. Estima de la proporción de los contribuyentes en la mezcla.
5. Establecer los criterios a valorar para los dos puntos siguientes, es decir, para la “categorización de la mezcla” y para la “toma de decisiones”.
6. Clasificación / categorización de la mezcla.
7. Toma de decisiones
8. Valoración estadística

En base a dichos pasos, y como se ha mantenido en párrafos anteriores, la primera cuestión será diseñar una completa validación para obtener los umbrales a aplicar para los pasos del 1 al 6.

## 0. Proceso de Validación de los Umbrales de Decisión:

Para el procedimiento de validación se recomienda seguir las indicaciones técnicas básicas referenciadas por el NIST (*National Institute of Standards and Technology*, EEUU) a través de Butler (2006b), las especificaciones de la *Scientific Working Group on DNA Analysis Methods* (SWGDM, 2003), los estándares de la *DNA Advisory Board* (DAB, 2000), así como las recomendaciones del Grupo de Trabajo de ADN de la *European Network of Forensic Science Institutes* (ENFSI DNA WORKING GROUP, 2010), y las directrices marcadas por la UNE-EN ISO/IEC 17025:2005 en su punto 5.4.

De forma más específica al tema de validación de **mezclas**, se recomienda seguir las directrices también marcadas por el NIST, a través de Butler (2010a, 2010b, 2010c, 2010d), Grgicak (2010), Coble (2010a, 2010b), Cotton (2010), Word (2010a, 2010b) y Moretti y colaboradores (2001a, 2001b). Y fundamentalmente, las especificaciones de la SWGDAM (2010) en su “Guía de Interpretación para el tipaje de STR autosómicos por laboratorios forenses de análisis de ADN”. Dicha guía recomienda a su vez una revisión de la bibliografía existente al respecto, para consensuar terminología y criterios. Con lo que se puede destacar las referencias de las directrices de Clayton y colaboradores (1998), y el artículo de Budowle y colaboradores (2009), que supone una importante revisión sobre la “Interpretación de Mezclas”. También representa una lectura obligada las recomendaciones de la ISFG (Gill et al., 2006), y las comisiones de Reino Unido (Gill et al., 2009), Alemania (Schneider et al., 2009), Australia (Stringer et al., 2009), y Holanda (Meulenbroek et al., 2011; Benschop et al., 2012).

Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, a continuación se sugieren los distintos umbrales/parámetros que ayudaran al laboratorio a la toma de decisiones en el proceso de interpretación de perfiles mezcla. Se recalca la importancia de cada uno de ellos, proponiéndose a su vez una posible estrategia de validación y el modo de valorarlo. En cualquier caso, se ha de destacar que cada laboratorio deberá acomodar o diseñar la estrategia de validación que mejor se adapte a sus propias características y/o necesidades. Y se insiste en que lo que se plantea en el presente documento es una propuesta, utilizada ya en algunos laboratorios.

### 0.1. Umbral Analítico (UA)

#### Concepto

Es el valor (en RFUs) que, en las condiciones analíticas empleadas por el propio laboratorio, genera la confianza suficiente para asegurar que cualquier pico dado a ese umbral o por encima del mismo, es realmente un amplicón de PCR (Budowle et al., 2009). Se trata, por tanto, del valor por debajo del cual los picos no pueden ser distinguidos del ruido de fondo (Butler, 2006). En definitiva, nos permite discriminar entre un pico y el ruido de fondo, y es dependiente de las condiciones y sistemas analíticos.

#### Propuesta de Validación

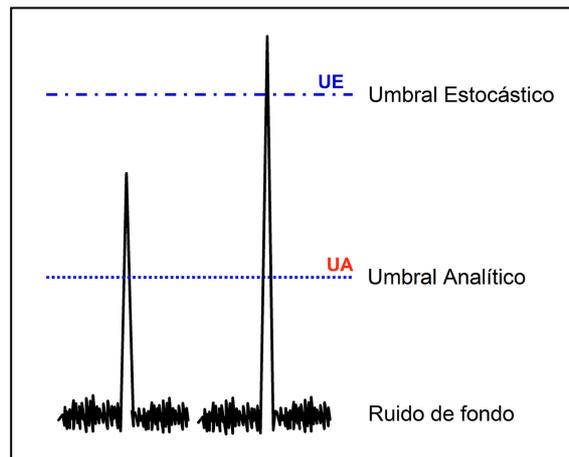
Tendrá que ser determinado en cada sistema de electroforesis capilar (EC) de forma empírica (SWGDM, 2010). Se hace necesario emplear cualquiera de los métodos

Ref. Doc.: Recomendaciones Comisión GHEPMIX	Edición: 01	Páginas: 3 de 25
---	-------------	------------------



que ofrezca confianza ante los efectos estocásticos. El valor umbral que denominan **MIT** (*Match Interpretation Threshold*) muestra al laboratorio el valor, por encima del cual, es razonable admitir que no ha existido una pérdida alélica (*drop-out*) en heterocigosis, y por tanto, se debe asumir que la presencia de un solo alelo debe considerarse como un genotipo homocigoto para ese *locus* (ver Figura 2).

Según Butler (2006), dicho nivel está aproximadamente en torno a los 150 -200 RFUs. Además, Butler (2006) también lo define como el nivel de ADN cuantificable por debajo del cual el perfil puede mostrar picos en grave desequilibrio (relación de altura de los picos inferiores al 60%).



**Figura 2.** Representación gráfica del Umbral Estocástico (UE) frente al Umbral Analítico (UA). En el ejemplo de la izquierda, aunque el pico representado sería considerado como pico-alélico, no se tendría la seguridad de que no ha habido una pérdida alélica. En el ejemplo de la derecha, sería razonable admitir que no ha habido una pérdida alélica en heterocigosis.

### Propuesta de Validación

Para calcular este umbral, se recomienda emplear diluciones seriadas pre-PCR de muestras seleccionadas que cumplan una serie de requisitos: previamente deben de haber sido analizadas, es decir, de genotipo conocido; y que preferiblemente tengan un elevado número de sistemas heterocigotos (Gill et al., 2008 y 2009). Se recomienda además, para alcanzar la suficiente confiabilidad, que las muestras que se encuentran en el rango donde comienzan a producirse pérdidas alélicas (*drop-out's*), sean sometidas a sucesivas repeticiones, hasta un total de 5 (Butler et al., 2004). Sin embargo, al igual que en el caso anterior, diversos factores (kit y equipo empleado, *input* de ADN, condiciones de electroforesis ...) pueden hacer variar ese valor del **UE**. Por tanto, el laboratorio deberá validar ese umbral para cada una de las condiciones de trabajo rutinarias (Butler, 2006b; Gill et al., 2008 y 2009; Budowle et al., 2009; Puch-Solis et al., 2011). Por ejemplo, se debería de tener un **UE** diferente para cada sistema de análisis y cada kit comercial.

### Cálculo

Habría básicamente 2 opciones para el cálculo del **UE**: se tomaría el valor en RFUs del alelo mayor para el cual se observa que en marcadores heterocigotos no se aprecia pérdida alélica (*drop-out* alélico) (SWGDM, 2010), o el tamaño máximo (en RFUs) del alelo compañero observado en caso de *drop-out* (Gill et al., 2008).

En cualquier caso, siempre es recomendable revisar la bibliografía a la búsqueda de cualquier actualización al respecto (p.ej. Gill et al., 2009; Westen et al., 2012). Como es el caso del método más o menos elaborado, propuesto por Gill y colaboradores (2009), para el cálculo del umbral estocástico (o como ellos proponen, “umbral *low-template-DNA*”), consistente en valorar la probabilidad de *drop-out*, representándola frente a la altura del alelo superviviente.

### 0.3. Umbral de “stutter” (US)

La aparición de picos *stutter* no suele generar problemas interpretativos en perfiles únicos, sin embargo, sí que lo es en la interpretación de perfiles mezcla. Para la interpretación de los resultados de tipaje de ADN, la SWGDAM (2010) establece (punto 3.1.) la necesidad de la valoración de los picos no alélicos (*no-allelic peaks*). Entre estos resalta, a parte la “adición de nucleótidos no dependientes de templado”, fluorocromos desasociados o la separación espectral incompleta, los *stutter*. Las bandas *stutter* constituyen una de las causas más comunes de aparición de extra-bandas durante el proceso de electroforesis. Estas bandas de repetición son bandas producidas por pérdida o ganancia de una o dos repeticiones completas en el momento de la replicación durante la PCR (Walsh et al., 1996; Butler, 2005; Coble, 2010a).

Revisando la bibliografía (Moretti et al., 2001a; Krenke et al., 2002; Greenspoon et al., 2004; Mulero et al., 2008; Hill et al., 2011), se puede observar que el porcentaje de aparición de bandas *stutter* es dispar, en función del *kit* comercial empleado, el locus considerado, o incluso, entre alelos de un mismo locus.

#### Concepto

Según se recoge en la guía SWGDAM (2010) (punto 3.5.8.2 y 3.5.8.3.), el valor del umbral de *stutter*, estimado en porcentaje (%) respecto al alelo principal, marcará el valor por encima del cual es razonable categorizar un determinado pico como alelo. En caso contrario, es decir, un valor de pico en posición *stutter* por debajo del valor del umbral de *stutter* aceptado, no podrá descartarse como pico real y deberá ser sometido a consideración por parte del laboratorio.

#### Propuesta de Validación

A pesar de la variabilidad con la que el umbral de *stutter* se presenta, la mayor parte de laboratorios emplean un valor medio de umbral del 15 % (Butler, 2005). Ahora bien, la guía de la SWGDAM (2010) establece (punto 3.1.1.1.) que dicho umbral y cualquier otro, ha de estar basado en criterios empíricos, es decir, en características cualitativas y/o cuantitativas de los picos.

A partir de muestras indubitadas, que *a priori* se supiera pertenecían a muestras de fuente única, y que hubieran sido amplificadas en condiciones habituales del laboratorio (recogido en los procedimientos de trabajo del mismo), la metodología recomendada consiste en valorar los productos *stutter*, al menos por locus, para una población relevante. Aunque lo ideal son al menos 5 observaciones de cada alelo (Coble, 2010a), ante la dificultad de conseguir 5 individuos diferentes por cada alelo recogido en la escalera alélica, y más si se considera el elevado polimorfismo que presentan algunos locus, se recomienda el empleo de una población (o a partir del histórico de muestras del laboratorio) de al menos 150 individuos.

Ref. Doc.: Recomendaciones Comisión GHEPMIX	Edición: 01	Páginas: 6 de 25
---	-------------	------------------

## Cálculo

El cálculo del ratio *stutter*, como ampliamente está descrito en la bibliografía (Moretti et al., 2001b; Leclair, 2004; Butler, 2005; Coble, 2010a; Westen et al., 2012), deberán consistir en dividir el valor en RFUs del pico -4 o +4 (en el caso del marcador D22S1045, en posiciones -3 y +3), por el pico alélico al que acompaña, y ese valor darlo en porcentaje. Los valores de *stutter* se deberán derivar de homocigotos y heterocigotos con alelos separados más de dos unidades de repetición (Moretti et al., 2001b), para evitar de ese modo efectos aditivos.

Y por último, con respecto a la forma de calcular el “**umbral de *stutter***”, se recomienda sumarle a la media del ratio *stutter* tantas veces la desviación estándar como la confianza que se quiera obtener de dicha medida (IUPAC, 1976). Así, Kaiser (1978) establece que un valor de  $k=3$ , resultará en “Umbrales de *stutter*” en los que el ratio *stutter* estará por debajo de dicho valor, con al menos una confianza del 89%, si el ratio *stutter* no se distribuye de forma normal, y de más del 99,86% de confianza, cuando el ratio *stutter* se distribuye de forma normal. Este método sigue las recomendaciones de la SWGDAM (2010), así como la mayor parte de la bibliografía (Moretti et al., 2001; Greenspoon et al., 2004; Hill et al., 2011; Coble, 2010a). Existen algunos autores que emplean la “media + 1SD” (Krenke et al., 2002) o incluso el ratio máximo de *stutter* obtenido (Mulero et al., 2008), pero se considera que son métodos demasiado poco conservadores, y se desaconseja su aplicación.

Adicionalmente, y siguiendo las indicaciones de Budowle y colaboradores (2009), se recomienda realizar una valoración de la proporción de *stutter* y del “umbral *stutter*” por locus/marcador considerado. Además, pudieran darse diferencias significativas en la proporción de *stutter* en función del rango de RFUs, por lo que se recomienda valorarlo. De este modo, por ejemplo, las mismas muestras empleadas en la validación se podrían agrupar en al menos 3 rangos de RFUs, y valorar cómo es su comportamiento.

## 0.4. Umbral de “balanceo de heterocigotos” (UB)

### Concepto

Para la interpretación de los resultados de tipaje de ADN, la SWGDAM (2010) establece qué se entiende como “proporción de la altura de pico” (del inglés *Peak Height Ratio* – **PHR**). Este término es similar al de “desequilibrio de heterocigotos” o “equilibrio de heterocigotos” (del inglés *heterozygote balance*, representado por **Hb**) (Butler, 2005; Gill et al., 2006). Pero realmente la anomalía es el desequilibrio, que describe la desproporción entre el área o la altura de los dos picos de un heterocigoto. De este modo, dicho balance heterocigoto será fundamental para determinar cuando un perfil es mezcla o no y en la valoración de las mismas. Está ampliamente recogido en la bibliografía, y se acepta de forma general, que en perfiles no mezclados con una cantidad de ADN superior a 200 pg, dicho balance de heterocigotos (Hb) o proporción de altura de picos (PHR) debe estar por encima de 0,6 (Butler, 2005).

Teóricamente, para un individuo heterocigoto, los 2 alelos de un mismo locus debería: tener igual cantidad en el genoma, amplificar igual en la PCR, inyectarse por igual en el analizador de fragmentos (EC), tener una altura de pico que fuera más o menos igual, y por lo tanto, que su valor de **Hb** o **PHR** fuera de  $\leq 100\%$  (Word, 2010a). Sin embargo, en casos reales esto no es así. Existen multitud de factores, que sin necesidad de tratarse de una mezcla, pueden alterar esta “normalidad”, como pueden ser alteraciones genéticas propias del individuo, alteraciones aleatorias del proceso de PCR, o a aquellas propias del ADN amplificado (poca cantidad de ADN –*low level DNA*–, variantes en la zona de hibridación del

primer) (Butler, 2005; Word, 2010a). De ahí la importancia de este parámetro a la hora de valorar perfiles mezclas.

### **Propuesta de Validación**

La metodología recomendada consiste en, a partir de muestras indubitadas, que son muestras de fuente única, y que hubieran sido amplificadas en condiciones óptimas, calcular el balance entre los dos alelos de aquellos *loci* heterocigotos. El número de muestras recomendadas a analizar es de entre 100-500 muestras (Word, 2010a).

### **Cálculo**

El cálculo del ratio PHR, como ampliamente está descrito en la bibliografía (Butler, 2005; Word, 2010a; SWGDAM, 2010 -punto 3.3.-), se definirá como el cociente entre el área/altura del pico de menor altura Y el área/altura del pico más alto (en RFUs), y expresado en porcentaje.

A la vista de los resultados obtenidos para el PHR, cada laboratorio debería calcular el “**umbral de PHR**” (**UB**), como el medio para establecer un filtro para la interpretación de perfiles mezcla de ADN. El mismo se podrá valorar, al igual que en el caso de otros umbrales, como la media de PHR del total de las muestras menos 3 veces la desviación estándar (IUPAC, 1976; Kaiser, 1978). Adicionalmente, se recomienda realizar la valoración del **UB**, tanto por *locus*/marcador considerado, como por tramos de RFUs (Budowle et al., 2009; Word, 2010a; SWGDAM, 2010 -punto 3.3.1-), ya que es muy diferente el comportamiento entre poca señal y mucha señal.

## **0.5. Umbral de “Proporción de contribuyentes” valorable**

### **Concepto**

La guía de la SWGDAM (2010), en su glosario, define la proporción de los contribuyentes de la mezcla (*mixture ratio*) como la proporción relativa y aproximada del aporte de ADN de los diferentes constituyentes a los resultados del perfil mezcla obtenido, determinada por el uso de la información cuantitativa de la altura de pico, la cual también puede ser expresada como un porcentaje. La recomendación de la SWGDAM (2010) (punto 3.5.3) es que el laboratorio debe definir otras características cuantitativas de la mezcla (precisamente ese *mixture ratio*, si es posible), ya que ese dato puede aportar una información de gran utilidad en la valoración e interpretación del perfil mezcla.

La cantidad de ADN debe ajustarse en base a la proporción de cada contribuyente, de forma que ambos produzcan resultados dentro del rango analítico. No será igual la cantidad de ADN de un componente en una mezcla con un ratio 1:1, que en una con un ratio 1:10, para una misma cantidad de ADN total de la mezcla.

### **Propuesta de Validación y cálculo**

Con lo que los objetivos que se buscarán para la validación de este parámetro, serán, en definitiva, contestar a las siguientes preguntas:

1. ¿Cuál es la proporción entre los contribuyentes de una mezcla que podemos interpretar y valorar en nuestro laboratorio con seguridad?
2. Y ¿entre qué rango de cantidad de ADN total de la mezcla podemos trabajar con fiabilidad?

Ref. Doc.: Recomendaciones Comisión GHEPMIX	Edición: 01	Páginas: 8 de 25
---	-------------	------------------

De este modo, la recomendación para valorar estos límites es la fabricación de mezclas artificiales con distintos rangos de ratios conocidos (p. ej. 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 y 1:10, y sus inversos, 10:1, 5:1, 4:1, 3:1 y 2:1) y a distintas concentraciones de ADN total de cada uno de ellos (p.ej. 1,5 ng; 1 ng; 0,75 ng; 0,5 ng; 0,25 ng y 0,1 ng). Sin embargo, la cantidad de muestras se puede reducir en función de un estudio previo de sensibilidad, permitiendo concentrar las muestras de análisis en torno al punto crítico.

Los perfiles de estas mezclas artificiales se deberán de valorar de formar ciega, es decir, sin conocerse *a priori* el genotipo que tendría que obtenerse. Los resultados obtenidos se compararán con los genotipos conocidos. Este planteamiento de validación puede ofrecernos una buena manera de conocer la “Proporción de contribuyentes” y el Límite de Análisis.

#### **0.6. Reproducibilidad (muestras de casuística, controles interlaboratorio)**

Como se indica en las especificaciones de la norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2005, con este ensayo se establece la reproducción de perfiles genéticos (con los marcadores del kit ensayado), con el mismo método, sobre el mismo extracto de ADN, por diferentes operadores, diferentes equipos de medidas (los disponibles en el laboratorio), en diferentes laboratorios, etc. Además, en el punto 2.6 de las recomendaciones de la SWGDAM (2003), con respecto al procedimiento de validación, se especifica que con este tipo de ensayo se pretende evaluar la capacidad para obtener resultados fiables a partir de muestras representativas de las que habitualmente se encuentran en los análisis del laboratorio.

De este modo, se recomienda el ensayo de muestras que dieran un perfil mezcla, al menos 5 (Butler et al., 2004), procedentes de ejercicios inter-laboratorio, y por tanto, de las que se dispusiera un resultado ya consensuada por los laboratorios participantes en dichos ejercicios. También se podrán emplear muestras que ya hubieran sido analizadas previamente y de las que se dispusiera de un resultado, con lo que el ensayo consistirá en consensuar dicho resultado. Este tipo de muestras se encuadrarían bajo el concepto de muestras “similares a casuística”, “case-type samples” según la SWGDAM (2003), o “probative and nonprobative casework” (Ensenberger et al., 2010; Prinz et al., 2001).

#### **0.7. Evaluación periódica de Umbrales**

Como se ha comentado extensamente a lo largo de cada uno de los puntos sobre los umbrales a valorar, algunos de estos son dependientes de las condiciones analíticas y/o del estado de los propios sistemas de análisis. Precisamente por estas circunstancias, se recomienda hacer evaluaciones periódicas. El laboratorio deberá de programar cómo y cada cuanto tiempo se han de realizar dichas comprobaciones. Por ejemplo, en el caso del Umbral Analítico (**UA**), se deberá de comprobar la estabilidad del mismo con los blancos de electroforesis empleados en todas las carreras en un periodo de tiempo determinado (p.ej. cada 6 meses), bajo las condiciones reales de trabajo.

## 0.8. Tabla resumen

A modo de resumen, se puede presentar la siguiente tabla (Tabla 1), modificada de SWGDAM (2010) y Butler (2010a), donde se detallan los “parámetros” o “umbrales” que se deberán de valorar para llevar a cabo la validación de la “Aceptación de Perfiles Genéticos Mezclas de STRs”.

Umbral a determinar	Opciones de valoración	Datos útiles de la Validación	Número de muestras recomendadas
<b>Analítico = ____ RFUs</b>	- Único valor total o, - Color específico	Niveles de ruido de fondo de controles negativos.	5 blancos x 5 inyecciones x 3 carreras
<b>Estocástico = ____ RFUs</b>	- Único valor total	Niveles en los que el <i>drop-out</i> se produce en muestras heterocigotas con poca cantidad de ADN, bajo las condiciones empleadas (p.ej. diferentes tiempos de inyección, purificación post-PCR)	2 series de diluciones seriadas x 5 repeticiones
<b>Stutter = ____ %</b>	- Locus-específico o, - Alelo-específico	<i>Stutter</i> en muestras de origen único (de gran ayuda si se examina en cantidades múltiples de DNA)	> 150 muestras (> 5 observaciones por <i>locus</i> o alelo)
<b>PHR (Hb) = ____ %</b>	- Perfil-específico - Locus-específico o - señal de la altura (cantidad) específicos	Proporción de altura de picos en Heterocigotos en muestras de origen único (de gran ayuda si se examina en cantidades múltiples de DNA)	100-500 muestras
<b>Ratio contribuyentes = ____</b>	Proporción mínima para valoración de componente minoritario	Definir la proporción de las mezclas con muestras conocidas para observar la coherencia entre los <i>loci</i> y evaluar la capacidad de deducir perfiles correctos de los contribuyentes	> 2 series de distintos ratios (≈ 11 ratios por serie)
<b>Rango <i>input</i> ADN<sub>i</sub> = ____ - ____</b>	Qué cantidad máxima y mínima de ADN puede ser empleada en la amplificación, y a la que se puede definir una mezcla con seguridad	Definir la el rango de <i>input</i> de ADN total de las mezclas con muestras conocidas para observar la coherencia entre los <i>loci</i> y evaluar la capacidad de deducir perfiles correctos de los contribuyentes	> 2 series de distintos <i>input's</i> de ADN (5-6 <i>input's</i> de ADN por serie)

**Tabla 1.** Tabla resumen de los parámetros – umbrales a determinar con la validación que deberá realizar el laboratorio para la interpretación de perfiles mezcla (modificado de SWGDAM, 2010; Butler, 2010a). En la misma, se especifican las “decisiones que se deberían tomar”, así como los “datos útiles para la Validación” y el número mínimo de muestras recomendadas para llevar a cabo la validación. Estos deberán marcar las directrices a seguir para la validación interna del laboratorio.

Hechas las consideraciones oportunas respecto a los parámetro/umbrales necesarios para la valoración de perfiles mezclas, a continuación se pasará a describir las recomendaciones para cada uno de los pasos para la interpretación de los resultados de perfiles mezclas. A lo largo de todo el texto aparecerán ejemplos, los cuales tratarán de ilustrar lo comentado en el mismo. Para evitar que pueda entenderse que dichos ejemplos han de ser considerados como recomendaciones en sí mismos, los mismos serán diferenciados del texto en otro formato (Arial 11 ptos >> Times New Roman 10 ptos).

## 1. Asignación de Alelos:

Este paso debe haberse definido en la fase de edición, estableciéndose qué picos son considerados como picos alélicos. Para ello el laboratorio debe configurar el software de análisis de forma adecuada (por ejemplo, deshabilitando el filtrado de bandas *stutter* “potenciales”).

### 1.1. Picos en posición no *stutter*

Se considerarán alelos todos aquellos picos cuyo tamaño en RFUs estén por encima del valor establecido por el **umbral analítico** (UA) (punto 0.1.), p.ej. 50 RFUs, y que no sean atribuibles a artefactos.

### 1.2. Picos en posición *stutter*

1.2.1. Un pico en una posición *stutter* con una altura de pico superior al valor establecido por el **umbral stutter** (punto 0.3.) para el marcador correspondiente. P.ej. si se ha establecido un valor del 7% de la altura correspondiente al alelo acompañante para el marcador TH01, un pico que constituya el 8%, sería considerado como un alelo real. Aquellos picos que puedan ser atribuibles a artefactos deben ser valorados.

1.2.2. Un pico en una posición *stutter* con una altura de pico inferior al valor establecido por el **umbral stutter** (punto 0.3.) para el marcador correspondiente. P.ej. continuando con el ejemplo del punto anterior, un pico que represente el 6% de la altura correspondiente al alelo acompañante, será considerado como un alelo potencial. Este tipo de picos, y solo estos, no deberá de ser descartados hasta la valoración final del perfil y del resto de muestras del caso.

1.2.3. Hay que tener precaución con aquellos picos situados entre alelos separados dos unidades de repetición, puesto que dichos picos podrían ser producto de los efectos aditivos de los +/- *stutter*.

## 2. Confirmación de un perfil mezcla:

Cada laboratorio deberá determinar el/los criterio/s mínimo/s que considerará para definir un perfil mezcla. Algunos de los que en la bibliografía (Clayton et al., 1998; Gill et al., 2006) se recogen son:

2.1. El número mínimo de *loci* con la presencia de al menos tres alelos, descartados artefactos (del tipo *stutter*, *drop-in*, *pull-up*, ...). Por ejemplo, más de dos *loci* con la presencia de al menos tres alelos.

Ref. Doc.: Recomendaciones Comisión GHEPMIX	Edición: 01	Páginas: 11 de 25
---	-------------	-------------------

- 2.2. El balance de altura para los dos alelos de un heterocigoto (*peak height ratio*, PHR), para uno o más *loci*, presenta un valor inferior al valor establecido por el **umbral de “balanceo de heterocigotos” (UB)** (punto 0.4.), p.ej. un valor inferior al 50%.
- 2.3. Desbalanceo en el marcador de la amelogenina entre los alelos X e Y (en el caso de tratarse de una mezcla entre varón y mujer –descartadas anomalías genética–). Como en el caso del punto anterior, dicho umbral de desbalanceo también deberá de ser calculado empíricamente del mismo modo que el umbral **UB** (punto 0.4.).

### **3. Número de contribuyentes:**

- 3.1. Cada laboratorio deberá establecer las líneas a seguir para la estima del número mínimo de contribuyentes a la mezcla. Para esta asignación, no es necesario que los alelos estén por encima del umbral estocástico (UE) (punto 0.2.), pero sí por encima del umbral analítico (UA) (punto 0.1.), atendiendo a lo descrito en el punto 1.
- 3.2. Cuando sea posible, el número mínimo de contribuyentes de una mezcla se establecerá atendiendo al número de alelos presentes en el marcador con mayor presencia de ellos. Por ejemplo, la presencia de 5 alelos en un marcador indica la presencia de al menos tres constituyentes en la mezcla.
- 3.3. Se recomienda que cada laboratorio establezca el número de contribuyentes por encima del cual no se podrá ni valorar ni emitir conclusiones sobre la mezcla.
- 3.4. Del mismo modo, para mezclas de 2 contribuyentes, se establecerá además una proporción máxima de dichos contribuyentes, por encima de la cual no se podrá ni valorar ni emitir conclusiones sobre la mezcla. En cualquier caso, dependiendo de la calidad del perfil, dicha proporción podrá variar.
- 3.5. Lo establecido tanto en el punto 3.3. como en el 3.4., deberá estar refrendado por lo establecido en la validación interna, según el punto 0.5. Se propone que se tomen decisiones del tipo: El laboratorio valorará estadísticamente mezclas que tengan como máximo **n** contribuyentes en proporción 1:**x** o inferior.

### **4. Aproximación a la Estima en la Proporción de los Contribuyentes:**

Cuando sea posible, se recomienda que se establezca la proporción aproximada en la que los contribuyentes aportan material genético a la mezcla. A medida que aumenta el número de contribuyentes, mayor es la dificultad para realizar una estima de la proporción de los componentes. En cualquier caso, las estimas son siempre aproximadas. Se podrán seguir las siguientes pautas, referido fundamentalmente a mezclas de 2 contribuyentes:

- 4.1. Se seleccionarán preferiblemente *loci* donde no haya alelos compartidos entre los constituyentes. Realizando la estima en tantos loci como sea posible.
- 4.2. El laboratorio deberá determinar la forma de realizar el cálculo de la proporción de los contribuyentes. Métodos válidos para su cálculo pueden ser:

- 4.2.1. Para un locus con la presencia de 4 alelos, dividir la suma de los dos alelos con mayor altura (RFUs) entre la suma de los dos alelos con menor altura. El valor indicará el ratio del mayor contribuyente respecto del menor.
- 4.2.2. O bien, el señalado por Gill y colaboradores (1998), y refrendado por las recomendaciones de la ISFG (Gill et al., 2006), aplicando el parámetro **M<sub>x</sub>**, y si se considera oportuno, reforzando el dato mediante el cálculo de los “mínimos cuadrados residuales” (Bill et al., 2004).
- 4.3. En la estima de proporciones debe considerarse el efecto sumatorio que las bandas *stutter* pueden generar en el dato final, lo cual puede ocasionar una aproximación imprecisa en dicha proporción de los contribuyentes y que puede ser fluctuante de un marcador a otro.
- 4.4. El laboratorio deberá estimar si se observa signos evidentes de degradación en algún componente de la muestra, en cuyo caso habrá que tener precaución en su valoración.

## **5. Criterios a valorar en la “categorización de mezclas” y “toma de decisiones”:**

En base a la validación realizada y los resultados obtenidos para los distintos parámetros (según punto 0), el laboratorio debe generar un **árbol de decisiones** (punto 7) que permita dar la misma respuesta ante situaciones similares. De este modo, y previo a la toma de decisiones, se deberían contemplar las siguientes consideraciones:

- 5.1. El laboratorio establecerá el ratio entre los contribuyentes de la mezcla (según punto 0.5 y 3.4) por encima del cual no es posible definir un perfil mezcla fiable en la asignación de los alelos que permita descartar al laboratorio asignaciones alélicas erróneas debidas a efectos de *drop-in*, *drop-out* y *stutter's*. Por encima de dicho ratio, en muchos casos solo es posible utilizar el perfil mayoritario.
- 5.2. A la vista del contexto del caso objeto de análisis, el laboratorio debe valorar si interesa identificar al contribuyente minoritario, mayoritario o bien a ambos constituyentes de la mezcla. Esta cuestión marcará las decisiones y exigencias que sobre la calidad del perfil deberán establecerse.
- 5.3. En relación con el punto anterior, el laboratorio debería determinar qué criterio de separación entre los componentes de la mezcla ha de utilizar. Se podría utilizar el ratio entre sus componentes o entre sus alelos, valorado marcador a marcador, por debajo del cual no se podría separar el componente mayoritario del minoritario. Aunque, por encima de dicho ratio, no necesariamente será posible hacer esa separación. Como ejemplo, se podría señalar mezclas con un ratio entre sus componentes superior o igual a 3:1 del mayoritario al minoritario (Luque, 2012), o 4:1 a lo largo de todos los sistemas heterocigotos (Schneider et al., 2009).
  - 5.3.1. Como regla general, el ratio entre los alelos para ser separado el componente mayoritario debe ser mayor que  $(n+1):1$ , donde  $n$  es el número teórico de contribuyentes (Luque, 2012). De este modo, por ejemplo, en mezclas de 2 individuos, para separar un alelo mayoritario de un minoritario, debe de tener un ratio de altura de 3:1 entre alelos.
  - 5.3.2. En cualquier caso, se ha de tener en cuenta que en algunos casos no pueden ser separados ambos componentes hasta un ratio de mezcla de 8:1, dependiendo de la combinación de los alelos y la

calidad del perfil. Normalmente, a partir de un ratio de mezcla de 10:1, la separación del mayoritario es segura (Luque, 2012).

5.4. Los laboratorios deberían determinar el número máximo de contribuyentes a la mezcla, para la cual el laboratorio puede emitir conclusiones (punto 3.3).

5.4.1. Se ha de tener en cuenta que cuanto mayor número de contribuyentes, mayor es la dificultad interpretativa de la mezcla. En función del número de contribuyentes (punto 3) y la proporción de éstos en la mezcla (punto 4), la interpretación y valoración del perfil mezcla puede verse comprometido.

5.5. Es recomendable que el laboratorio establezca un número mínimo de marcadores (excluyendo el gen de la amelogenina) que cumplan los criterios de calidad y seguridad establecidos en el propio laboratorio en base a la validación. Esto ayudará a categorizar el perfil y a su vez a la toma de decisiones sobre el mismo (por ejemplo: perfiles con 10 o más marcadores se emplearán para incluir/excluir y será objeto de valoración estadística, entre 5 y 9 marcadores sólo se emplearán a efectos de exclusión y no se valorarán estadísticamente, y con menos de 5 marcadores no se emplearán ni para incluir/excluir y no se valorarán estadísticamente).

5.5.1. En cualquier caso, para aceptar un marcador como válido, y por tanto, dentro del cómputo de marcadores aceptados, se deberá establecer un valor mínimo de señal RFUs, que deberá venir marcado por el umbral estocástico (UE), calculado empíricamente (según el punto 0.2). Igualmente, se deberá marcar un valor máximo de señal RFUs, también calculado empíricamente (según el punto 0.5.), y que se correspondería con el Límite de Linealidad (*Limit of Linearity*). Butler (2010b) plantea que dicho límite debería estar en torno a 5.000 RFUs. Por encima de dicho valor, la cámara CCD puede llegar a saturarse y los picos no reflejarán con precisión las cantidades relativas de señal (p.ej. picos de cima plana), y llevarán a *pull-up's* y/o transferencias entre los canales de fluorocromos.

5.6. Además, se recomienda que aquellos laboratorios que empleen distintos kits comerciales con distintos *loci*, y que puedan generar perfiles “composite”, los perfiles mezclas que contribuyan al perfil “composite” deberán ser obtenidos a partir del mismo extracto en múltiples amplificaciones y/o inyecciones. Cuando extractos distintos de diferentes localizaciones de una evidencia dada sean combinados antes de la amplificación, el perfil de ADN resultante no se considerará perfil “composite”. Si no hay una certeza razonable de que el origen de la/s muestra/s son de una fuente común (p.ej. hisopos vaginales duplicados, hueso o muestras de referencia de un mismo individuo), los datos alélicos de extractos separados de diferentes localizaciones de una evidencia dada, no deberán ser combinados en un perfil “composite”. El laboratorio deberá establecer una guía para determinar la conveniencia de desarrollar perfiles “composite” para tales muestras (SWGDM, 2010).

5.7. Y por último, se recomienda, para facilitar el trabajo del laboratorio, que en función de los criterios establecidos en los puntos anteriores, se elaboren fórmulas verbales que registren todas las circunstancias posibles ante la evaluación de un perfil mezcla y que se recogería en el apartado de conclusiones de los dictámenes generados.

Establecidos estos criterios mínimos, para ilustrar este cuadro y a modo de ejemplo, se puede plantear el siguiente supuesto: un perfil mezcla de al menos dos contribuyentes con una proporción 1:3 y que presenta al menos 11 marcadores valorables (cuyos alelos registrados están no solo por encima del umbral analítico, p.ej. 50 RFUs, sino por encima del umbral estocástico, p.ej. 150 RFUs, y no superan el límite de linealidad establecido, p.ej. en 5.000 RFUs). Como se establecerá, según la “toma de decisiones” (punto 7) en base a la categorización (punto 6) realizada sobre dicho perfil mezcla, el mismo podrá:

Ref. Doc.: Recomendaciones Comisión GHEPMIX	Edición: 01	Páginas: 14 de 25
---	-------------	-------------------

- ser empleado a efectos de inclusión y de descarte en el contexto de la casuística del laboratorio.
- serán objeto del cálculo estadístico oportuno, en caso de disponer de muestra de comparación.
- y serán susceptibles de ser incorporados a base de datos criminales (si es el caso).

## 6. Categorización de la Mezcla:

El laboratorio, a la vista de su validación (punto 0) y de las consideraciones señaladas (punto 5), debería ser capaz de categorizar el perfil mezcla. Esto le permitirá una adecuada toma de decisiones sobre el perfil obtenido (punto 7).

De este modo, y una vez que el laboratorio haya aplicado aquellas estrategias analíticas alternativas (las cuales se recomienda que hayan sido sometidas a un proceso de validación), se propone que el perfil sea encuadrado en alguna alternativa dentro de la “Categorización de la Mezcla” que haya sido adoptada. Por ello, se recomienda que el laboratorio, una vez revisada la bibliografía (Schneider et al., 2009; SWGDAM, 2010; Gill, 2011; Luque, 2012; Meulenbroek et al., 2011; entre otros), plantee una clasificación clara y efectiva para los propósitos de valoración e interpretación de mezclas.

La “German Stain Commission” (Schneider et al., 2009) estableció una clasificación clara y adecuada. No obstante, se recomienda las revisiones realizadas por Gill (2011) y Luque (2012), que terminan de complementarla considerando supuestos adicionales. Como también hace la clasificación recogida en las recomendaciones de la SWGDAM (2010). Esta tiene la limitación de que está basada en el análisis estadístico posterior que se pudiera hacer de la mezcla. Por tanto, no contempla aquellos perfiles mezcla que, por sus características, pudieran ser considerados como **no concluyentes** (punto 7.4). También es interesante la clasificación del “Netherlands Forensic Institute” (NFI), plasmada por Meulenbroek y colaboradores (2011) y evaluada por Benschop y colaboradores (2012). Esta se origina de la posterior comparación entre los perfiles de las muestras dubitadas y los de las muestras indubitadas, con la limitación que eso supone, al no permitir una categorización de la mezcla de forma ciega (Krane et al., 2008).

Por todo ello, se propone la siguiente categorización dinámica, en función de qué interés de la mezcla y que permitiría saltar de una categoría a otra para una apropiada toma de decisiones (punto 7). Esta categorización está basada fundamentalmente en la desarrollada por la “German Stain Commission” (Schneider et al., 2009) y complementada por el resto de clasificaciones revisadas (SWGDAM, 2010; Gill, 2011; Luque, 2012; Meulenbroek et al., 2011; Benschop et al., 2012). De este modo, ante un perfil mezcla, el mismo podrán ser incluido en alguno de los siguientes tipos:

6.1. **Tipo A:** mezclas con **contribuyentes indistinguibles** (Schneider et al., 2009; Gill, 2011; Luque, 2012), es decir, no hay un contribuyente mayoritario obvio, y donde todos los alelos de todos los *loci* están por encima del UE (umbral estocástico), determinado el mismo a partir de la validación interna (punto 0.2.).

En este tipo no se pueden incluir mezclas con evidentes efectos estocásticos (Schneider et al., 2009), y por tanto, se excluirían mezclas con claras señales de degradación (Luque, 2012).

6.2. **Tipo B:** mezclas con **componentes mayoritario y minoritario claramente definidos y distinguibles** (Schneider et al., 2009; Gill, 2011).

Esta mezclas implicarían que el componente mayoritario (independientemente de que el mismo fuera de origen único o mezcla), podría ser separado a lo largo de todos los

Ref. Doc.: Recomendaciones Comisión GHEPMIX	Edición: 01	Páginas: 15 de 25
---	-------------	-------------------

*loci*. El laboratorio deberá determinar qué criterio de separación ha de utilizar (según punto 5.3). Además, en este tipo de mezclas, no ha de haber evidencias de efectos estocásticos.

6.2.1. **Tipo B.1:** mezclas cuyo **componente mayoritario** sea de **origen único**. En estas mezclas interesa el componente mayoritario, que podrá ser valorado como un perfil de fuente única.

6.2.2. **Tipo B.2:** mezclas en las que interesa el **componente mayoritario**, que es de **origen múltiple**. Estas son mezclas en las cuales un perfil mayoritario, compuesto por 2 o más individuos, puede ser separado (según punto 5.3). En estos casos, el perfil mayoritario mezcla debe ser evaluado de forma separada como una mezcla de **Tipo A** (Luque, 2012).

6.2.3. **Tipo B.3:** mezclas en las que interesa el **componente minoritario**, independientemente de que este sea de origen único o múltiple. Al no poderse separar el componente minoritario, se deberá considerar todo el perfil conjunto, pasándose a valorar como una mezcla de **Tipo A**.

En el caso de que el componente minoritario y/o el mayoritario sea múltiple, para poder llevar a cabo su valoración como una mezcla de **Tipo A**, nunca se podrá superar el número máximo de contribuyentes a la mezcla, para la cual el laboratorio pueda emitir conclusiones (según el punto 5.4).

6.3. **Tipo C:** mezclas con efectos estocásticos y/o degradación.

Estos son los perfiles de ADN obtenidos a partir de la amplificación de muestras con bajo contenido de ADN y/o pobre calidad de ADN, donde la ocurrencia de pérdidas alélicas (*allelic drop out*) y/o pérdidas de un *locus* (*locus drop out*) tienen que ser asumidas (Schneider et al., 2009). En este tipo se incluyen perfiles mezcla con un componente incompleto (Luque, 2012). Estos perfiles se deberán de valorar y comprobar si, una vez descartados aquellos *loci* en los que algunos de sus alelos están por debajo del UE, se ha conseguido rescatar al menos el número mínimo de marcadores (excluyendo el gen de la amelogenina) que el laboratorio haya determinado (según punto 5.5). En cuyo caso, una vez descartados aquellos *loci* que no cumplen los criterios establecidos por el laboratorio (según punto 5), estos perfiles podrían pasar a ser re-catalogados como:

6.3.1. **Tipo CA:** mezclas con **contribuyentes indistinguibles**. Pueden ser valoradas como una mezcla de **Tipo A**.

6.3.2. **Tipo CB.1:** mezclas en las que interese el **componente mayoritario de origen único**. Pueden ser valoradas como una mezcla de **Tipo B.1**.

6.3.3. **Tipo CB.2:** mezclas en las que interese el **componente mayoritario múltiple**. Pueden ser valoradas como una mezcla de **Tipo B.2** y, por tanto, como una mezcla **Tipo A**.

6.3.4. **Tipo CB.3:** mezclas en las que interese el **componente minoritario**. Pueden ser valoradas como una mezcla de **Tipo B.3** y, por tanto, como una mezcla **Tipo A**.

6.3.5. **Tipo CC:** todos los componentes están en bajo nivel y el perfil resulta ininterpretable (Gill, 2011; Luque, 2012).

## **7. Toma de decisiones:**

Sustentado en los criterios establecidos en el punto 5, basados a su vez en la validación realizada y los resultados obtenidos para los distintos parámetros (según punto 0), y en la categorización que se haya establecido en el laboratorio (según punto 6), el laboratorio deberá tomar decisiones del tipo:

- 7.1. **Tipo A, Tipo B.2, Tipo CA y Tipo CB.2:** estas mezclas con contribuyentes indistinguibles y/o no separables, siempre que no se supere el número máximo de contribuyentes a la mezcla para la cual el laboratorio puede emitir conclusiones (según el punto 5.4), podrían ser empleadas tanto para inclusión como para exclusión y, en el caso de inclusión deberán ser objeto del tratamiento estadístico correspondiente (desarrollado en el punto 8).
- 7.2. **Tipo B.1 y Tipo CB.1:** mezclas en las que interesa el componente mayoritario de origen único, el cual puede ser separable y, por tanto, puede ser comparado, evaluado y registrado como un perfil de fuente única. Se debería de indicar que se trata de un perfil mayoritario más un componente minoritario. Este perfil mayoritario de origen único podría ser empleado a efectos de inclusión y exclusión y, en el caso de inclusión, como en el punto 7.1., deberá ser objeto del tratamiento estadístico correspondiente (según punto 8).
- 7.3. **Tipo B.3 y Tipo CB.3:** mezclas con un mayoritario y un minoritario (de origen único o mezcla), en las que interesa el perfil no mayoritario. Se han de valorar o registrar como un perfil de Tipo A (el perfil completo). Como en el caso de los tipos de mezclas señalados en el punto 7.1, en primer lugar, se ha de tener en cuenta que no supere el número máximo de contribuyentes a la mezcla, para la cual el laboratorio puede emitir conclusiones (según el punto 5.4). Por otro lado, siempre que todos sus alelos estén por encima del UE y el ratio con respecto al componente mayoritario no supere el umbral de "Proporción de contribuyentes" valorable (según punto 0.5 y 5.1), podría ser usado tanto para inclusión como para exclusión y cálculos estadísticos. En caso de superar este ratio (punto 5.1), tan sólo podría ser empleado para exclusión. En cualquier caso, ningún minoritario deberá ser registrado nunca de forma separada, porque los alelos podrían estar enmascarados con el perfil mayoritario
- 7.4. **Tipo CC:** las mezclas con evidentes efectos estocásticos o con todos sus *loci* o la mayoría de los mismos (según punto 5.5) con alelos por debajo del UE, se han de declarar como perfiles **no concluyentes**, pues no cumplirían lo dispuesto en los criterios de aceptación de perfiles mezclas (según el punto 0) y, por lo tanto, no permitirían emitir conclusiones sobre el mismo.

## **8. Análisis estadístico e interpretación final de los resultados del tipaje:**

En Genética Forense, los cálculos son aplicados a perfiles genéticos de evidencias que se establecen como relevantes en el contexto de un caso para ayudar a la valoración de la significación de una inclusión (SWGDM, 2010). Estos cálculos deberán estar basados en análisis estadísticos probabilísticos.

Con respecto a los análisis estadísticos aplicables a la valoración de perfiles mezcla, a grandes rasgos, se sugiere seguir las recomendaciones de la ISFG (Gill et al., 2006), a saber:

8.1. Según la **Recomendación 1** de la ISFG: “Para perfiles mezcla el LR (*Likelihood Ratio* o Coeficiente de Verosimilitud) es la aproximación estadística más adecuada”.

8.1.1. Se desaconseja cualquier otra aproximación, pero en caso de decidir emplearla, como también se indica en la Recomendación 1 de la ISFG, “se restringe el uso de la Probabilidad de exclusión o RMNE a perfiles sin ambigüedad, no pudiéndose utilizar cuando el perfil obtenido es de baja calidad y los alelos minoritarios puedan quedar enmascarados en las bandas de repetición de los alelos mayoritarios o cuando se puedan producir pérdidas alélicas del perfil minoritario”.

8.2. Según la **Recomendación 3** de la ISFG: “Para calcular la LR en mezclas, sin tener en cuenta los datos cuantitativos, se recomienda el método descrito por Evett y colaboradores (1991) y Weir y colaboradores (1997).”

8.3. Según la **Recomendación 4** de la ISFG: “Si en el cálculo de la LR se utilizan datos cuantitativos para eliminar varios de los genotipos de los posibles en los cálculos, se debe realizar basándose en las líneas maestras desarrolladas por Clayton y colaboradores (1998).

8.4. Antes de aplicar el LR, se recomienda establecer claramente las hipótesis de trabajo,  $H_1$  (hipótesis de la acusación o  $H_p$ ) y  $H_2$  (hipótesis de la defensa o  $H_d$ ), siendo el cálculo final del LR, como se recoge en la siguiente fórmula:

$$LR = \frac{\Pr(E | H_1)}{\Pr(E | H_2)}$$

8.5. Para el correcto cálculo del LR, se han de emplear las frecuencias alélicas de los loci analizados que correspondan a la población de referencia apropiada. Es de suma importancia elegir la población de referencia adecuada.

8.5.1. Para el caso de los laboratorios de España, se recomienda utilizar la base de datos de población española (García et al., 2012).

8.6. Para alcanzar una integra interpretación de los datos aportados de los perfiles mezcla, se aconseja una completa revisión de las recomendaciones de la ISFG (Gill et al., 2006), así como de las comisiones de Gran Bretaña (Gill et al., 2009), Alemania (Schneider et al., 2009) y Australia (Stringer et al., 2009). Igualmente, se recomienda que el laboratorio se encuentre actualizado con cuanta literatura genere la comunidad científica al respecto.

8.7. Se hace necesario que en los informes periciales que genere el laboratorio quede plasmado de modo claro y conciso las hipótesis empleadas para el cálculo del LR. Además, en su apartado de conclusiones, se deberán de recoger las explicaciones oportunas con respecto al valor del LR obtenido, señalando que dicho valor indica cuantas veces es más probable encontrar los hallazgos del caso (o el perfil genético obtenido de los mismos), **condicionado** a la hipótesis de la acusación ( $H_1$  o  $H_p$ ) frente a la hipótesis de la defensa ( $H_2$  o  $H_d$ ).

8.8. El LR es el valor estadístico que proporciona la valoración de la evidencia genética y, por tanto, el valor obtenido por el laboratorio. Debe ser la autoridad judicial la que combine el valor de la evidencia genética (LR) con el valor de las evidencias no genéticas para la valoración final. Por tanto, no deben usarse predicados verbales, ya es el juez quien debe tomar la decisión final con el total de las evidencias del caso (genéticas y no genéticas).

## **9. Nota Final:**

A partir de todos los criterios mínimos establecidos en los puntos del 1 al 8, y apoyado en una validación interna, según las sugerencias señaladas en el punto 0, se recomienda que cada laboratorio elabore un protocolo normalizado de trabajo (**PNT**) que recoja todos estos particulares, y que sirva de guía para el trabajo diario del laboratorio cuando se enfrente ante un perfil mezcla.

## Referencias y Literatura citada:

- Benschop CCG, Haned H, de Blaeij TJP, Meulenbroek AJ, Sijen T (2012). Assessment of mock cases involving complex low template DNA mixtures: A descriptive study. *Forensic Sci Int Genet.* (en prensa), <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.04.007>
- Bill M, Gill P, Curran J, Clayton T, Pinchin R, Healy M, Buckleton J (2004). PENDULUM—a guideline based approach to the interpretation of STR mixtures. *Forensic Sci Int* 148:181–189.
- Budowle B, Onorato AJ, Callaghan TF, Della Manna A, Gross AM, Guerrieri RA, Luttman JC, McClure DL (2009). Mixture interpretation: defining the relevant features for guidelines for the assessment of mixed DNA profiles in forensic casework. *J Forensic Sci.* 54(4):810-21.
- Butler JM (2005) *Forensic DNA Typing* 2ª Ed. Elsevier
- Butler JM (2006). Validation Workshop. HID University/Future Trends in Forensic DNA Technology, May 10, 2006. URL: [http://www.cstl.nist.gov/strbase/pub\\_pres/ValidationWorkshop\\_May2006.pdf](http://www.cstl.nist.gov/strbase/pub_pres/ValidationWorkshop_May2006.pdf)
- Butler JM (2010a). SWGDAM Autosomal STR Interpretation Guidelines. ISHI 2010 Mixture Interpretation Workshop: Principles, Protocols, and Practice. San Antonio, TX. October 14, 2010. URL: <http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/NISTpub.htm>
- Butler JM (2010b). Introduction to the SWGDAM Guidelines and the Mixture Literature. ISHI 2010 Mixture Interpretation Workshop: Principles, Protocols, and Practice. San Antonio, TX. October 14, 2010. URL: <http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/training.htm>
- Butler JM (2010c). Number of Contributors. ISHI 2010 Mixture Interpretation Workshop: Principles, Protocols, and Practice. San Antonio, TX. October 14, 2010. URL: <http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/training.htm>
- Butler JM (2010d). Mixture Ratios. ISHI 2010 Mixture Interpretation Workshop: Principles, Protocols, and Practice. San Antonio, TX. October 14, 2010. URL: <http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/training.htm>
- Butler JM, Tomsey CS, Kline MC (2004). Can the Validation Process in Forensic DNA Typing Be Standardized?. 15th International Symposium on Human Identification.
- Clayton TM, Whitaker JP, Sparkes R, Gill P (1998). Analysis and interpretation of mixed forensic stains using DNA STR profiling. *Forensic Sci Int.* 91(1):55-70.
- Coble MD (2010a). Stutter. ISHI 2010 Mixture Interpretation Workshop: Principles, Protocols, and Practice. San Antonio, TX. October 14, 2010. URL: <http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/training.htm>
- Coble MD (2010b). Statistical Approaches (CPI, LR, RMP). ISHI 2010 Mixture Interpretation Workshop: Principles, Protocols, and Practice. San Antonio, TX. October 14, 2010. URL: <http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/training.htm>
- Cotton RW (2010). Amplification Variation and Stochastic Effects. ISHI 2010 Mixture Interpretation Workshop: Principles, Protocols, and Practice. San Antonio, TX. October 14, 2010. URL: <http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/training.htm>
- DNA Advisory Board (DAB) (2000). Quality Assurance Standards for Forensic DNA Testing Laboratories. URL: <http://www.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/july2000/codis2a.htm> / <http://www.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/july2000/codis1a.htm>
- ENFSI DNA WORKING GROUP (2010). Recommended Minimum Criteria for the Validation of Various Aspects of the DNA Profiling Process (approved November 2010). URL: <http://www.enfsi.eu>
- Ensenberger MG, Thompson J, Hill B, Homick K, Kearney V, Mayntz-Press KA, Mazur P, McGuckian A, Myers J, Raley K, Raley SG, Rothove R, Wilson J, Wiczorek D, Fulmer PM, Storts DR, Krenke BE (2010). Developmental validation of the PowerPlex 16 HS System: an improved 16-locus fluorescent STR multiplex. *Forensic Sci Int Genet.* 4(4):257-64.
- Evett IW, Buffery C, Willot G, Stoney D (1991). A guide to interpreting single locus profiles of DNA mixtures in forensic cases. *J Forensic Sci Soc* 31:41-47.
- García O, Alonso J, Cano JA, García R, Luque GM, Martín P, Martínez de Yuso I, Maulini S, Parra D, Yurrebaso I (2012). Population genetic data and concordance study for the kits Identifiler, NGM, PowerPlex ESX 17 System and Investigator ESSplex in Spain. *Forensic Sci Int Genet.* 6(2): e78-e79.

- Gill P (2011). The rough guide to STR mixture interpretation. Day 1: Introduction Evaluating DNA profiles by allelic peak heights (theory and practice). ISFG Vienna, Mixtures interpretation workshop. 29-30 August, 2011. URL: <http://www.isfg.com>
- Gill P, Brenner CH, Buckleton JS, Carracedo A, Krawczak M, Mayr WR, Morling N, Prinz M, Schneider PM, Weir BS (2006). DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on the interpretation of mixtures. *Forensic Sci Int.* 160:90–101.
- Gill P, Brown RM, Fairley M, Lee L, Smyth M, Simpson N, Irwin B, Dunlop J, Greenhalgh M, Way K, Westacott EJ, Ferguson SJ, Ford LS, Clayton T, Guinness J, (2008). National recommendations of the Technical UK DNA working group on mixture interpretation for the NDNAD and for court going purposes. *Forensic Sci Int Genet.* 2(1):76–82.
- Gill P, Puch-Solis R, Curran J (2009). The low - template (stochastic) threshold - Its determination relative to risk analysis for national DNA databases. *Forensic Sci Int Genet* 3(2):104-11.
- Gill P, Sparkes R, Pinchin R, Clayton T, Whitaker J, Buckleton J (1998). Interpreting simple STR mixtures using allele peak areas. *Forensic Sci Int* 91:41–53.
- Greenspoon SA, Ban JD, Pablo L, Crouse CA, Kist FG, Tomsey CS, Glessner AL, Mihalacki LR, Long TM, Heidebrecht BJ, Braunstein CA, Freeman DA, Soberalski C, Nathan B, Amin AS, Douglas EK, Schumm JW (2004). Validation and implementation of the PowerPlex 16 BIO System STR multiplex for forensic casework. *J Forensic Sci.* 49(1):71-80.
- Grgicak CM (2010). Analytical Thresholds: Determination of Minimum Distinguishable Signals. ISHI 2010 Mixture Interpretation Workshop: Principles, Protocols, and Practice. San Antonio, TX. October 14, 2010. URL: <http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/training.htm>
- Hill CR, Diewer DL, Kline MC, Sprecher CJ, McLaren RS, Rabbach DR, Krenke BE, Ensenberger MG, Fulmer PM, Storts DR, Butler JM (2011). Concordance and population studies along with stutter and peak height ratio analysis for the PowerPlex ® ESX 17 and ESI 17 Systems. *Forensic Sci Int Genet.* 5(4):269-275.
- IUPAC (1976). Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis – II. Data interpretation. *Pure & Appl Chem.* 45:99-103.
- Kaiser H (1978). Foundations for the critical discussion of analytical methods. *Spectrochim Acta* 33B:551-576.
- Krane DE, Ford S, Gilder JR, Inman K, Jamieson A, Koppl R, Kornfield IL, Risinger DM, Rudin N, Taylor MS, Thompson WC (2008). Sequential Unmasking: A Means of Minimizing Observer Effects in Forensic DNA Interpretation. *J Forensic Sci* 53(4):1006-7.
- Krenke BE, Tereba A, Anderson SJ, Buel E, Culhane S, Finis CJ, Tomsey CS, Zchetti JM, Masibay A, Rabbach DR, Amriott EA, Sprecher CJ (2002). Validation of a 16-locus fluorescent multiplex system. *J Forensic Sci.* 47(4):773-785.
- Leclair B, Fréreau CJ, Bowen KL, Fournay RM (2004). Systematic analysis of stutter percentages and allele peak height and peak area ratios at heterozygous STR loci for forensic casework and database samples. *J Forensic Sci.* 49(5):968-980.
- Luque JA (2012). Chapter 15. Interpretation Guideline for Mixed-STR Multilocus Electrophoretic Profiles. En: Alonso A (ed). *DNA Electrophoresis Protocols for Forensic Genetics, Methods in Molecular Biology* vol. 830 (Springer Protocols). New York: Humana Press. pp. 213-229.
- Meulenbroek AJ, Sijen T, Benschop CCG, Kloosterman AD (2011). A practical model to explain results of comparative DNA testing in court. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser* 3:e325–e326.
- Moretti TR, Baumstark AL, Defenbaugh DA, Keys KM, Brown AL, Budowle B (2001a). Validation of STR typing by capillary electrophoresis. *J Forensic Sci.* 46(3):661-676.
- Moretti TR, Baumstark AL, Defenbaugh DA, Keys KM, Smerick JB, Budowle B (2001b). Validation of short tandem repeats (STRs) for forensic usage: performance testing of fluorescent multiplex STR systems and analysis of authentic and simulated forensic samples. *J Forensic Sci.* 46(3):647-60.
- Morling N, Bastisch I, Gill P, Schneider MP (2007). Interpretation of DNA mixtures—European consensus on principles. *Forensic Sci Int Genet* 1: 291–292.
- Mulero JJ, Chang CW, Lagacé RE, Wang DY, Bas JL, McMahon TP, Hennessy LK (2008). Development and validation of the AmpFISTR MiniFiler PCR Amplification Kit: a MiniSTR multiplex for the analysis of degraded and/or PCR inhibited DNA. *J Forensic Sci.* 53(4):838-52.
- Prinz M, Ishii A, Coleman A, Baum HJ, Shaler RC (2001). Validation and casework application of a Y chromosome specific STR multiplex. *Forensic Sci Int* 120(3):177-88.

<b>Ref. Doc.:</b> Recomendaciones Comisión GHEPMIX	<b>Edición:</b> 01	<b>Páginas:</b> 21 de 25
--	--------------------	--------------------------

- Puch-Solis R, Kirkham AJ, Gill P, Read J, Watson S, Drew D (2011). Practical determination of the low template DNA threshold. *Forensic Sci. Int. Genet.* 5(5): 422-427.
- Schneider PM, Fimmers R, Keil W, Molsberger G, Patzelt D, Pflug W, Rothämel T, Schmitter H, Schneider H, Brinkmann B (2009). The German Stain Commission: recommendations for the interpretation of mixed stains. *Int J Legal Med* 123:1–5.
- Stringer P, Scheffer JW, Scott P, Lee J, Goetz R, Ientile V, Eckhoff C, Turbett G, Carroll D, Harbison S (2009). Interpretation of DNA mixtures—Australian and New Zealand consensus on principles. *Forensic Sci Int Genet.* 3(2):144-145.
- Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM) (2003). Revised validation guidelines (approved July 2003). URL: [http://www.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/july2004/standards/2004\\_03\\_standards02.htm](http://www.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/july2004/standards/2004_03_standards02.htm)
- SWGDM (2010). SWGDM Interpretation Guidelines for Autosomal STR Typing by Forensic DNA Testing Laboratories (approved January 2010). URL: [http://www.fbi.gov/hq/lab/html/codis\\_swgdam.htm](http://www.fbi.gov/hq/lab/html/codis_swgdam.htm)
- UNE-EN ISO/IEC 17025:2005. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.
- Walsh PS, Fildes NJ, Reynolds R (1996). Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic Acids Res.* 24(14):2807-28012.
- Weir BS, Triggs CM, Starling L, Stowell KAJ, Buckleton J (1997). Interpreting DNA mixtures. *J Forensic Sci* 42:213-222.
- Westen AA, Grol LJW, Harteveld J, Matai AS, de Knijff P, Sijen T (2012). Assessment of the stochastic threshold, back- and forward stutter filters and low template techniques for NGM. *Forensic Sci Int Genet.* (en prensa), <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.05.001>
- Word CJ (2010a). Peak Height Ratios. ISHI 2010 Mixture Interpretation Workshop: Principles, Protocols, and Practice. San Antonio, TX. October 14, 2010. URL: <http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/training.htm>
- Word CJ (2010b). Mixture Principles & Reporting Basics. ISHI 2010 Mixture Interpretation Workshop: Principles, Protocols, and Practice. San Antonio, TX. October 14, 2010. URL: <http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/training.htm>

## **Lecturas adicionales sugeridas:**

### **Generales**

- Buckleton J, Triggs CM, Walsh SJ (2005). *Forensic DNA Evidence Interpretation*. CRC Press
- Butler JM (2005a). Developmental Validation. Validation Workshop, Aug. 24, 2005 at NFSTC. URL: <http://www.cstl.nist.gov/strbase/validation/DevelopmentalValidation.pdf>
- Butler JM (2006a). Validation: Debunking some urban legends surrounding validation within the forensic community. *Profiles in DNA* 9(2):3-6.
- Gill P, Whitaker J, Flaxman C, Brown N, Buckleton J (2000). An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA. *Forensic Sci Int.* 112(1):17–40.
- LEY ORGÁNICA 10/2007, de 8 de octubre, reguladora de la base de datos policial sobre identificadores obtenidos a partir del ADN. (BOE núm. 242, 9 octubre 2007)
- Long GL, Winefordner JD (1983). Limit of detection: a closer look at the IUPAC definition. *Analytical Chemistry* 55:712A-724A.
- REAL DECRETO 1977/2008, de 28 de noviembre, por el que se regula la composición y funciones de la Comisión Nacional para el uso forense del ADN. (BOE núm. 298, 11 diciembre 2008)

### **Generales sobre Mezclas**

- Bright JA, Turkington J, Buckleton J (2010). Examination of the variability in mixed DNA profile parameters for the Identifiler multiplex. *Forensic Sci Int Genet.* 4(2):111-114.
- Budowle, Chakraborty R, Van Daal A (2010). Authors' Response to Commentary on: Budowle B, Onorato AJ, Callaghan TF, Della Manna A, Gross AM, Guerrieri RA, Luttmann JC, McClure DL.

<b>Ref. Doc.:</b> Recomendaciones Comisión GHEPMIX	<b>Edición:</b> 01	<b>Páginas:</b> 22 de 25
--	--------------------	--------------------------

- Mixture interpretation: defining the relevant features for guidelines for the assessment of mixed DNA profiles in forensic casework. *J Forensic Sci* 2009;54(4):810-21. *J Forensic Sci.* 55(1):269-72.
- Dror IE, Hampikian G (2011). Subjectivity and bias in forensic DNA mixture interpretation. *Science & Justice*, (en prensa), doi:10.1016/j.scijus.2011.08.004
- Nurit B, Anat G, Michal S, Lilach F, Maya F (2011). Evaluating the prevalence of DNA mixtures found in fingernail samples from victims and suspects in homicide cases. *Forensic Sci Int Genet.* 5(5):532-537.
- Puch-Solis R, Pope S, Evett I (2010). Calculating likelihood ratios for a mixed DNA profile when a contribution from a genetic relative of a suspect is proposed. *Sci Justice* 50(4):205-9.
- Gill P, Buckleton J (2010). Commentary on: Budowle B, Onorato AJ, Callaghan TF, Della Manna A, Gross AM, Guerrieri RA, Luttmann JC, McClure DL. Mixture interpretation: defining the relevant features for guidelines for the assessment of mixed DNA profiles in forensic casework. *J Forensic Sci* 2009;54(4):810-21. *J Forensic Sci.* 55(1):265-8.
- Tomsey CS, Kurtz M, Flowers B, Fumea J, Giles B, Kucherer S (2001). Case work guidelines and interpretation of short tandem repeat complex mixture analysis. *Croatian Medical Journal*, 42, 276-280.
- Torres Y, Flores I, Prieto V, López-Soto M, Farfán MJ, Carracedo A, Sanz P (2003). DNA mixtures in forensic casework: a 4-year retrospective study. *Forensic Science International*, 134, 180-186.
- Wetton JH, Lee-Edghill J, Archer E, Tucker VC, Hopwood AJ, Whitaker J, Tully G (2011). Analysis and interpretation of mixed profiles generated by 34 cycle SGM Plus amplification. *Forensic Science International: Genetics*, 5(5), 376-380.

## Glosario para este documento:

**Artefacto:** Picos artificiales no alélicos, que aparecen en el electroferograma como consecuencia de diversas anomalías (eléctricas, componentes de la electroforesis, parámetros de electroforesis, condiciones de la PCR), y que pueden enmascarar o confundir el resultado final de una edición.

**Contribuyente mayoritario:** El individuo que aporta mayor cantidad de ADN (material biológico) a un perfil mezcla.

**Contribuyente minoritario:** El individuo que aporta menor cantidad de ADN (material biológico) a un perfil mezcla.

**Drop-out:** Pérdida de alelo achacable a muestras con escasa cantidad de ADN por procesos estocásticos de amplificación selectiva de un alelo sobre otro en marcadores heterocigotos o bien como consecuencia de muestras degradadas.

**Efecto estocástico:** La observación de un desbalanceo alélico intra-*locus* y/o un *drop-out* alélico resultado del azar y/o amplificación desproporcionada de alelos en templados de baja cantidad (SWGAM, 2010).

**Inconcluyente:** Una interpretación o conclusión en la que los resultados del tipaje de ADN son insuficientes, bajo los parámetros de aceptación de resultados del laboratorio, insuficientes para fines comparativos.

**Likelihood ratio (LR):** El *ratio* de dos probabilidades del mismo evento bajo hipótesis mutuamente excluyentes. Normalmente el numerador contempla la hipótesis del fiscal, mientras que el denominador argumenta la de la defensa.

**Mixture ratio:** La proporción estimada en la que se presentan los distintos contribuyentes de una mezcla. Se determina en base a la información de la altura de pico.

**Peak Height Ratio (PHR):** Aplicable a genotipos heterocigotos. Se calcula, para un determinado locus, dividiendo la altura del pico con menor valor de RFUs por el pico con mayor altura de RFUs y multiplicando por 100 el valor obtenido, expresando de esta manera en tanto por ciento el valor.

**Perfil “composite”:** Perfil generado como resultado del empleo de distintas estrategias (parámetros electroforéticos, modificaciones en la estrategia de amplificación por PCR, distintos kits...), pero SIEMPRE de una fuente común, es decir, del mismo extracto de ADN inicial o muestra original.

**Perfil genético:** Registro alfanumérico resultante del análisis de marcadores STRs de un extracto de ADN procedente de muestras biológicas.

**Perfil genético único:** Perfil generado a partir de un solo contribuyente.

**Perfil parcial:** Perfil genético caracterizado por no aparecer la composición alélica de todos los marcadores analizados.

**Perfil mayoritario:** Aquel que es posible ser discriminado de forma inequívoca del resto de perfiles de la mezcla (puede ser único, o a su vez producto de una mezcla). Como criterio general se considera aquel genotipo que al menos se presenta en una proporción superior en tres veces (considerando los valores de RFUs) con respecto al perfil o perfiles acompañantes en la mezcla.

**Perfil mezcla:** Perfil generado por la aportación de al menos dos personas.

**Pull-up:** Picos que falsamente pueden ser confundidos con alelos. El exceso de producto amplificado, para un/os determinado/s *locus* puede ocasionar una saturación del canal de detección de dicho locus produciendo reflejos en forma de *pull-up* en los canales adyacentes. Se caracterizan porque tienen la misma ubicación espacial (en otro canal) que el alelo que lo genera.

**RFUs:** Relative Fluorescent Unit, unidades de fluorescencia que el software asigna a los picos generados en función de la fluorescencia emitida por los mismos.

**Spikes:** se trata de un tipo de artefacto provocado por diferentes motivos (eléctricos, cristales de urea...) cuya morfología es similar a un alelo real aunque con una anchura inferior y que se refleja al menos en dos canales de fluorescencia.

**STRs autosómicos:** Polimorfismo genético de longitud ubicado en los cromosomas autosómicos. La variabilidad entre individuos radica en el número de veces que se repite en tándem un cierto bloque de nucleótidos (habitualmente en el campo forense de 4 bases)

**STRs de cromosoma Y:** Polimorfismo genético de longitud ubicado en el cromosoma Y. La variabilidad entre individuos radica en el número de veces que se repite en tándem un cierto bloque de nucleótidos (habitualmente en el campo forense de 4 bases)

**Stutter-band:** Artefactos generados durante la reacción de PCR como consecuencia del *slippage* de la polimerasa que se traducen en picos que habitualmente tienen un tamaño con 4 bases menos que el alelo real ( $n-4$ ) que le precede y no suelen superar el 15 % del área del alelo principal. Ocasionalmente también se pueden presentar *stutters*  $n+4$  (4 bases más largo que el alelo principal).