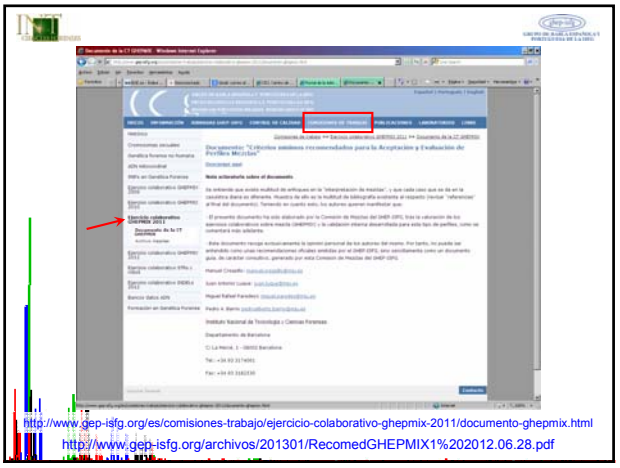
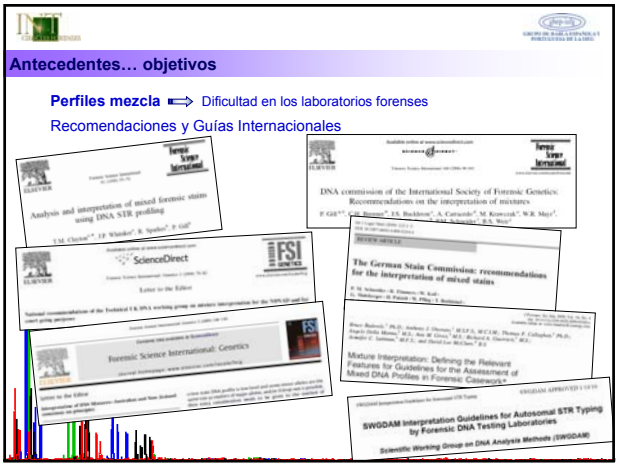
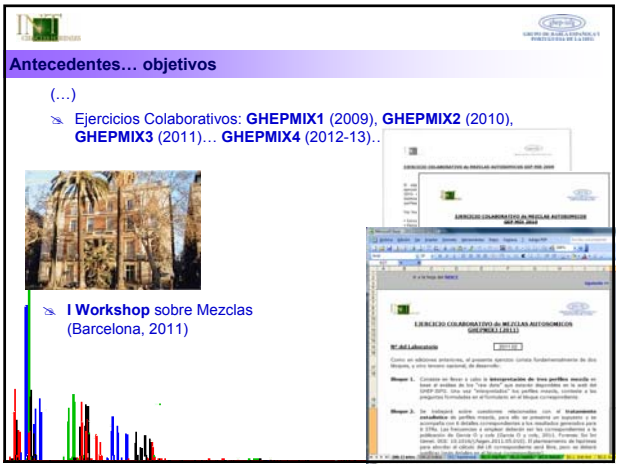
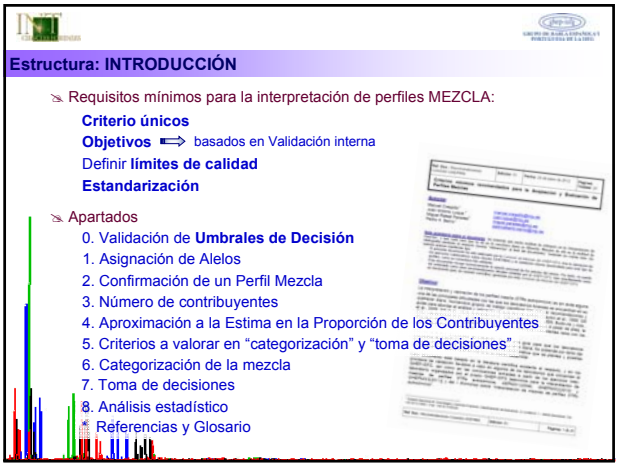
INTCF-Barcelona
Servicio de Biología
Recomendaciones de la Comisión de Trabajo de Mezclas del GHEP-ISFG (GHEPMIX).
"Criterios mínimos recomendados para la Aceptación y Evaluación de Perfiles Mezcla" (Ed. 01)
Pedro A. Barrio
pedroalberto.barrio@mju.es


http://www.ghep-isfg.org/es/comisiones-trabajo/ejercicio-colaborativo-ghepmix-2011/documento-ghepmix.html
http://www.ghep-isfg.org/archivos/201301/RecomedGHEPMIX1%202012.06.28.pdf


Antecedentes… objetivos
Perfiles mezcla ⟹ Dificultad en los laboratorios forenses
Recomendaciones y Guías Internacionales
Analysis and interpretation of mixed forensic stains using DNA STR profiling
DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on the interpretation of mixtures
ScienceDirect
The German Stain Commission: recommendations for the interpretation of mixed stains
Forensic Science International: Genetics
Mixture Interpretation: Defining the Relevant Features for Guidelines for the Assessment of Mixed DNA Profiles in Forensic Casework
SWGDAM Interpretation Guidelines for Autosomal STR Typing by Forensic DNA Testing Laboratories

Antecedentes… objetivos
Forensic Science International: Genetics Supplement Series
A practical model to explain results of comparative DNA testing in court
Forensic Science International: Genetics
Assessment of mock cases involving complex low template DNA mixtures: A descriptive study
Consensus and pool profiles to assist in the analysis and interpretation of complex low template DNA mixtures
Forensic Science International: Genetics
DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on the evaluation of STR typing results that may include drop-out and/or drop-in using probabilistic methods


Antecedentes… objetivos
(…)
Ejercicios Colaborativos: GHEPMIX1 (2009), GHEPMIX2 (2010), GHEPMIX3 (2011)… GHEPMIX4 (2012-13)..
I Workshop sobre Mezclas (Barcelona, 2011)


Estructura: INTRODUCCIÓN
Requisitos mínimos para la interpretación de perfiles MEZCLA:
Criterio únicos
Objetivos ⟹ basados en Validación interna
Definir límites de calidad
Estandarización
Apartados
0. Validación de Umbrales de Decisión
1. Asignación de Alelos
2. Confirmación de un Perfil Mezcla
3. Número de contribuyentes
4. Aproximación a la Estima en la Proporción de los Contribuyentes
5. Criterios a valorar en "categorización" y "toma de decisiones"
6. Categorización de la mezcla
7. Toma de decisiones
8. Análisis estadístico
Referencias y Glosario

Estructura: APARTADOS

0. Validación de **Umbrales de Decisión**
1. Asignación de Alelos
2. Confirmación de un Perfil Mezcla
3. Número de contribuyentes
4. Aproximación a la Estima en la Proporción de los Contribuyentes
5. Criterios a valorar en "categorización" y "toma de decisiones"
6. Categorización de la mezcla
7. Toma de decisiones
8. Análisis estadístico

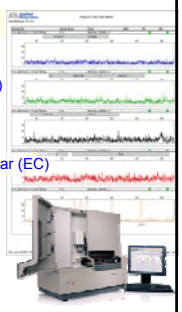
* Referencias y Glosario

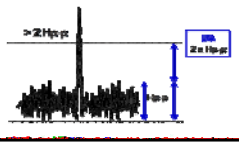
0. Validación de Umbrales de Decisión

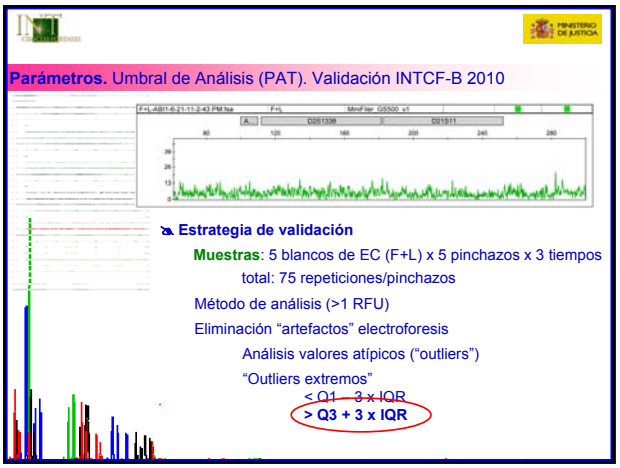
- Sub-apartados
  - 0.1. Umbral Analítico (UA)
  - 0.2. Umbral Estocástico (UE)
  - 0.3. Umbral de "stutter" (US)
  - 0.4. Umbral de "balanceo de heterocigotos" (UB)
  - 0.5. Umbral de "proporción de contribuyentes" valorable
  - 0.6. Reproducibilidad (muestras de casuística, controles interlaboratorio)
  - 0.7. Evaluación periódica de Umbrales
  - 0.8. Tabla resumen
- Estructura
  - Concepto
  - Propuesta de validación
  - Cálculo

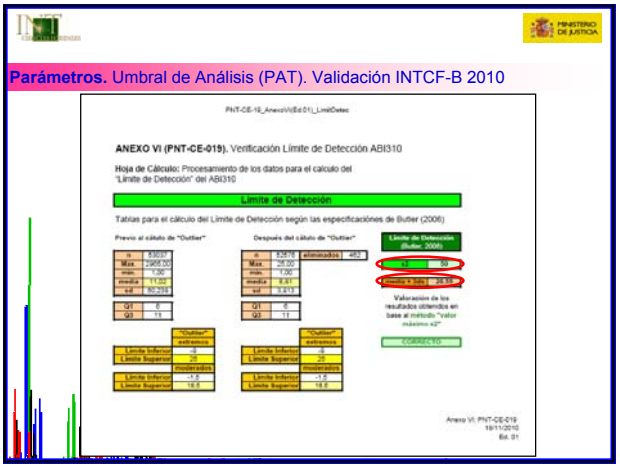
0.1. Umbral Analítico (UA)

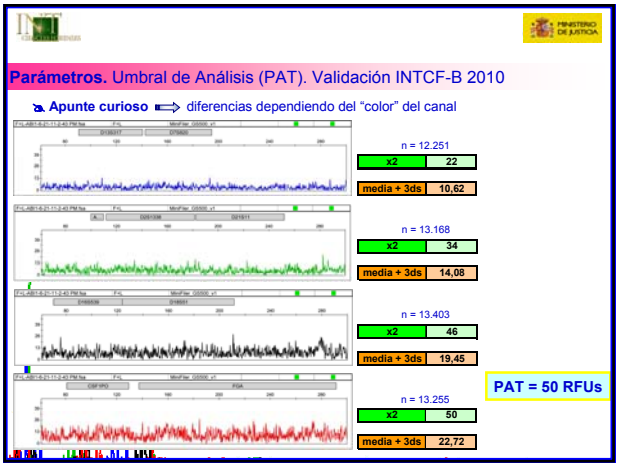
- **Concepto**
  - Definiciones de Budowle et al. (2009) y Butler (2006)
  - Discriminar entre pico / ruido de fondo
- **Propuesta de Validación**
  - Determinado en cada sistema de electroforesis capilar (EC)
  - Métodos: (1) C-/blancos (2) diluciones ADN
  - Factores que influyen
- **Cálculo**
  - 2 x pico más alto (SWGDAM, 2010)

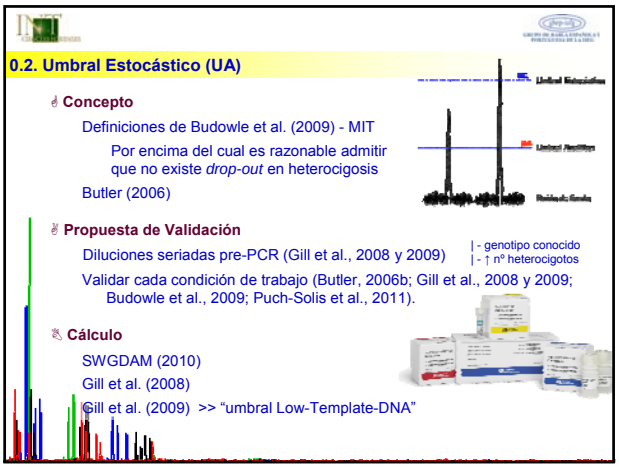


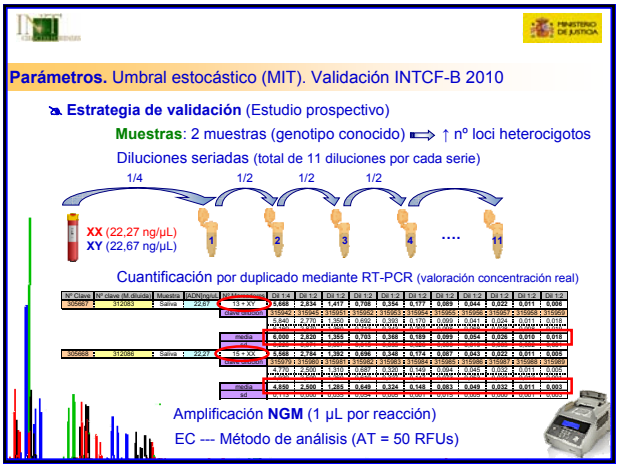


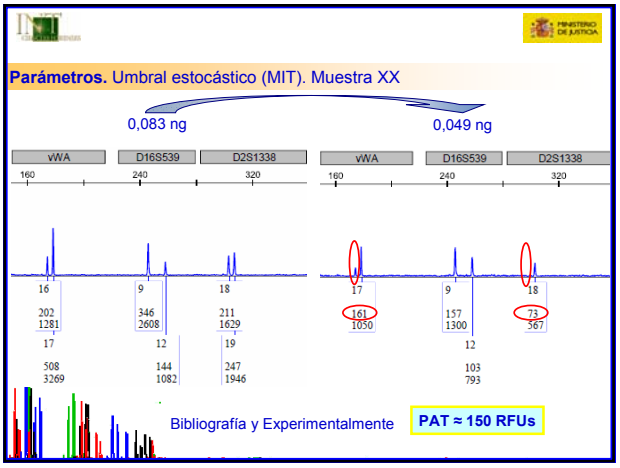

Parámetros. Umbral de Análisis (PAT). Validación INTCF-B 2010
Estrategia de validación
Muestras: 5 blancos de EC (F+L) x 5 pinchazos x 3 tiempos
total: 75 repeticiones/pinchazos
Método de análisis (>1 RFU)
Eliminación "artefactos" electroforesis
Análisis valores atípicos ("outliers")
"Outliers extremos"
< Q1 – 3 x IQR
> Q3 + 3 x IQR


Parámetros. Umbral de Análisis (PAT). Validación INTCF-B 2010
ANEXO VI (PNT-CE-019). Verificación Límite de Detección ABI310
Límite de Detección


Parámetros. Umbral de Análisis (PAT). Validación INTCF-B 2010
Apunte curioso diferencias dependiendo del "color" del canal
n = 12.251
x2 22
media + 3ds 10,62
n = 13.168
x2 34
media + 3ds 14,08
n = 13.403
x2 46
media + 3ds 19,45
n = 13.255
x2 50
media + 3ds 22,72
PAT = 50 RFUs


0.2. Umbral Estocástico (UA)
Concepto
Definiciones de Budowle et al. (2009) - MIT
Por encima del cual es razonable admitir que no existe drop-out en heterocigosis
Butler (2006)
Propuesta de Validación
Diluciones seriadas pre-PCR (Gill et al., 2008 y 2009)
| - genotipo conocido
| - ↑ nº heterocigotos
Validar cada condición de trabajo (Butler, 2006b; Gill et al., 2008 y 2009; Budowle et al., 2009; Puch-Solis et al., 2011).
Cálculo
SWGDAM (2010)
Gill et al. (2008)
Gill et al. (2009) >> "umbral Low-Template-DNA"


Parámetros. Umbral estocástico (MIT). Validación INTCF-B 2010
Estrategia de validación (Estudio prospectivo)
Muestras: 2 muestras (genotipo conocido) ⇒ ↑ nº loci heterocigotos
Diluciones seriadas (total de 11 diluciones por cada serie)
1/4
1/2
1/2
1/2
XX (22,27 ng/µL)
XY (22,67 ng/µL)
1
2
3
4
....
11
Cuantificación por duplicado mediante RT-PCR (valoración concentración real)
Amplificación NGM (1 µL por reacción)
EC --- Método de análisis (AT = 50 RFUs)


Parámetros. Umbral estocástico (MIT). Muestra XX
0,083 ng
0,049 ng
vWA
D16S539
D2S1338
vWA
D16S539
D2S1338
Bibliografía y Experimentalmente
PAT ≈ 150 RFUs

0.3. Umbral de "stutter" (US)

- **Concepto**
  - Definición de SWGDAM (2010)
    - > *US*, razonable categorizar un determinado pico como alelo

Typically **5-15%** of true allele in tetranucleotide repeats STR loci

- **Propuesta de Validación**
  - Muestras indubitadas (nº relevante) >> 5 observaciones x alelo (Coble, 2010)
  - 5 observaciones x alelo / 150 muestras
- **Cálculo**
  - Ratio *stutter* (Moretti et al., 2001b; Leclair, 2004; Butler, 2005; Coble, 2010a; …)
  - Umbral *stutter* (**US**) >> "media + k*DS"
    - **K = 3** (Kaiser, 1976) para un I.C. 89% - 99,86 %
  - Recomendación de Budowle et al. (2006)
    - (i) valoración por locus
    - (iii) y/o valoración por rango RFUs

Parámetros. Ratio de Stutter. Validación INTCF-B 2011. Valoración total

- **Estrategia de validación**
  - Kit para la validación: **NGM** (Applied Biosystem)
  - Input de ADN **0.5-1 ng** (muestras indubitadas, "histórico" de proyectos)
  - Selección muestras (n = 134) --- 2.745 alelos
  - Método de análisis (AT = 40 RFUs)
  - Cálculo de stutter → $\text{Stutter \%} = \frac{\text{N-4 ó N+4 peak}}{\text{allele peak}}$
  - "umbral de stutter" = media + 3 d.s.

Totales

	ratio stutter (H)		ratio stutter (A)
media	6,98	media	7,14
d.s.	2,29	d.s.	2,42
nº alelos	2745	nº alelos	2745
media+2ds	11,56	media+2ds	11,98
media+3ds	13,85	media+3ds	14,40

< 15 % (teórico, según Butler)

Parámetros. Ratio de Stutter. Valoración stutter -4 (por rango RFUs)

		Totales		D22S1045		D16S539		
		ratio stutter (H)	ratio stutter (A)	ratio stutter (H)	ratio stutter (A)	ratio stutter (H)	ratio stutter (A)	
< 1000 RFUs	media	6,24	5,63	9,75	10,76	6,94	5,66	< 1000 RFUs
	d.s.	2,04	2,33	2,87	3,17	1,28	1,35	
	nº alelos	610	610	37	37	20	20	
	media+2ds	12,33	13,29	[illegible]	[illegible]	9,45	9,56	
	media+3ds	14,37	15,62	17,47	20,27	10,71	10,91	
1000-2000 RFUs	media	7,08	7,20	5,57	9,02	5,06	4,89	1000-2000 RFUs
	d.s.	2,07	2,17	3,08	3,23	1,51	1,47	
	nº alelos	1022	1022	84	84	61	61	
	media+2ds	11,22	11,55	[illegible]	[illegible]	7,57	7,83	
	media+3ds	13,30	13,72	17,69	19,73	9,58	9,29	
2000-3000 RFUs	media	6,51	6,58	7,50	7,82	5,03	4,80	> 2000 RFUs
	d.s.	2,21	2,24	2,78	2,85	1,35	1,33	
	nº alelos	546	546	53	53	76	76	
	media+2ds	10,94	11,07	[illegible]	[illegible]	7,74	7,47	
	media+3ds	13,16	13,31	15,93	16,35	9,09	8,80	
3000-4000 RFUs	media	6,54	6,50					
	d.s.	2,03	1,98					
	nº alelos	223	223					
	media+2ds	10,60	10,46					
	media+3ds	12,63	12,43					
> 4000 RFUs	media	6,64	6,56					
	d.s.	1,99	1,90					
	nº alelos	166	166					
	media+2ds	10,61	10,36					
	media+3ds	12,59	12,26					

0.4. Umbral de "balanceo de heterocigotos" (UB)

Concepto

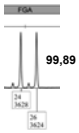
PHR (*Peak Height Ratio*) (SWGDAM, 2010)

Hb (*Heterozigote balance*) (Butler, 2005; Gill et al., 2006) ≈

Teoría: para un individuo **heterocigoto**, los 2 alelos de un único locus debería:

- Tener igual cantidad en el genoma
- Amplificar igual
- Inyectarse por igual
- Tener una altura de pico que sea ~ igual
- Su valor debe de ser ≤100%

No se ajusta a la realidad



99,89 %

Propuesta de Validación

Muestras indubitadas: 100-500 (Word, 2010a)

Cálculo

Ratio PHR (Butler, 2005; Word, 2010a; SWGDAM, 2010 -punto 3.3.-)

Umbral PHR (**UB**) >> "media + 3*DS"

Recomendación de Budowle et al. (2006)

(ii) valoración por locus

(iii) valoración por tramos de RFUs

Parámetros. Ratios PHR. Validación INTCF-B 2011

Estrategia de validación

Kit para la validación: **NGM** (Applied Biosystem)

Input de ADN 0.5-1 ng (muestras indubitadas, "histórico" de proyectos)

Selección muestras (n = 128) --- 1.657 loci

Método de análisis (AT = 50 RFUs)

Cálculo de PHR → $PHR\ \% = \frac{\text{pico A (menor RFU)}}{\text{pico B (mayor RFU)}} \times 100$

"umbral de PHR" = media – 3 d.s.

(i) valor único empírico

Totales	Hb (Hp/Hg)	Hb (Ap/Ag)
media	85,75	85,86
d.s.	11,20	11,33
nº loci	1657	1657
media+2ds	63,35	63,19
media+3ds	52,15	51,86

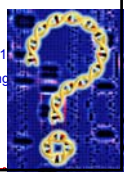
< 60-70 % (teórico)

Parámetros. Ratios PHR. Valoración por rango de RFUs (iii y iv)

		Totales Hb (Hp/Hg)	Totales Hb (Ap/Ag)	D16S539 Hb (Hp/Hg)	D16S539 Hb (Ap/Ag)	D22S1045 Hb (Hp/Hg)	D22S1045 Hb (Ap/Ag)	D19S433 Hb (Hp/Hg)	D19S433 Hb (Ap/Ag)	
< 1000 RFUs	media	84,02	84,31	83,30	82,65	80,99	81,30	83,28	82,86	< 1000 RFUs
	d.s.	12,04	12,04	9,87	9,38	13,07	13,71	14,12	15,63	
	nº loci	685	685	26	26	32	32	30	30	
	media+2ds	59,94	60,23	63,57	63,88	54,86	53,87	55,03	51,61	
	media+3ds	47,90	48,18	53,70	54,50	41,80	40,16	40,91	35,99	
1000-2000 RFUs	media	86,68	86,87	86,82	86,63	85,58	85,92	85,78	85,97	1000-2000 RFUs
	d.s.	9,27	9,20	7,77	7,66	9,52	9,91	9,45	9,17	
	nº loci	542	542	29	29	37	37	37	37	
	media+2ds	68,13	68,48	71,28	71,20	66,54	66,48	66,67	67,03	
	media+3ds	58,86	59,26	63,51	63,64	57,02	56,19	57,41	58,46	
2000-3000 RFUs	media	88,91	88,85	87,20	87,30	85,12	83,85	87,28	87,57	> 2000 RFUs
	d.s.	7,78	7,77	8,37	8,04	9,58	12,53	8,60	7,94	
	nº loci	268	268	28	28	24	24	45	45	
	media+2ds	73,35	73,30	70,46	71,23	66,02	59,90	70,09	71,69	
	media+3ds	65,57	65,52	62,09	63,19	56,47	46,27	61,49	63,75	
3000-4000 RFUs	media	88,31	88,26							
	d.s.	8,98	9,81							
	nº loci	112	112							
	media+2ds	70,33	68,65							
	media+3ds	61,34	58,84							
> 4000 RFUs	media	80,93	79,06							
	d.s.	15,88	17,62							
	nº loci	47	47							
	media+2ds	49,45	43,93							
	media+3ds	33,28	26,21							

0.5. Umbral de "proporción de contribuyentes" valorable

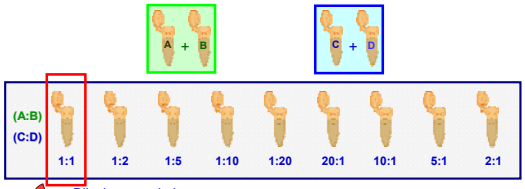
- **Concepto**
  - *Mixture ratio* (SWGDAM, 2010)
  - *Input* ADN debe ajustarse a la proporción de cada contribuyente
- **Propuesta de Validación y cálculo**
  - **Objetivos de la Validación.** Contestar a las preguntas:
    - ¿Cuál es la proporción entre los contribuyentes de una mezcla que podemos interpretar y valorar en nuestro laboratorio con seguridad?
    - Y ¿entre qué rango de cantidad de ADN total de la mezcla podemos trabajar con fiabilidad?
  - ***Recomendación***: Mezclas artificiales
    - Rango ratios conocidos: 1:1; 1:2; 1:3, 1:4; 1:5; 1:10; 10:1; 5:1
    - Distintas [ADN total]: 1,5ng; 1ng; 0,75ng; 0,5ng; 0,25ng; 0,1ng
    - Valoración a ciegas



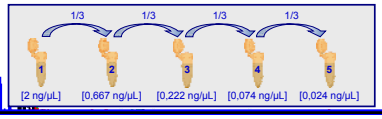
Parámetros. Proporción de Contribuyentes. Validación INTCF-B 2011

- **Estrategia de validación (cont.)**

Mezclas con ***ratios*** **conocidos = 9 mezclas** por cada pareja



Diluciones seriadas (5 diluciones por mezcla = 90 mezclas)



Parámetros. Proporción de Contribuyentes. Validación INTCF-B 2011

- **Estrategia de validación (cont.)**

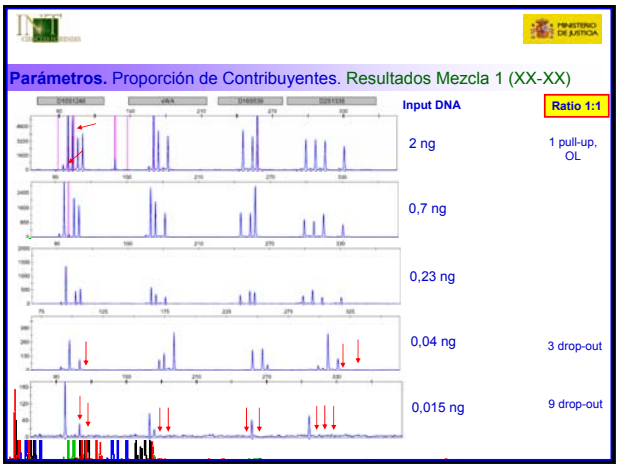
Amplificación de 1 µL de cada mezcla --- kit **NGM** (Applied Biosystem)

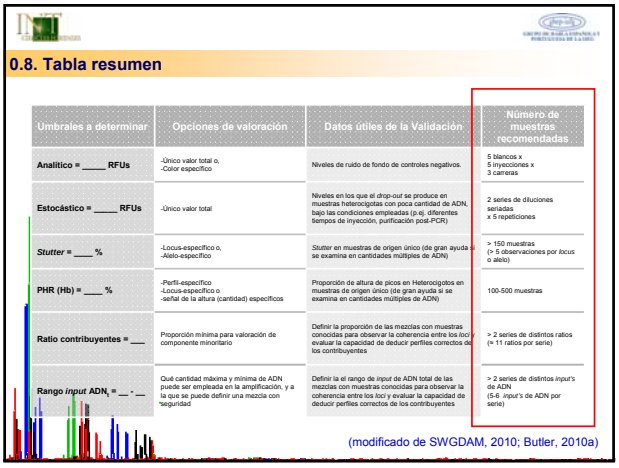
90 reacciones

Método de análisis ("NGM mix") del GeneMapper ID v3.2

Edición "ciega" de los perfiles

Valoración --- comparación con genotipos conocidos





0.8. Tabla resumen

Umbrales a determinar	Opciones de valoración	Datos útiles de la Validación	Número de muestras recomendadas
Analítico = _____ RFUs	-Único valor total o, -Color específico	Niveles de ruido de fondo de controles negativos.	5 blancos x 5 inyecciones x 3 carreras
Estocástico = _____ RFUs	-Único valor total	Niveles en los que el drop-out 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
***Stutter* = ____ %**	-Locus-específico o, -Alelo-específico	*Stutter* en muestras de origen único (de gran ayuda si se examina en cantidades múltiples de ADN)	> 150 muestras (> 5 observaciones por *locus* o alelo)
PHR (Hb) = ____ %	-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 ADN)	100-500 muestras
Ratio contribuyentes = ___	Proporción mínima para valoración de componente minoritario	Definir la proporción de las mezclas con muestras conocidas para observar la coherencia entre los *loci* y evaluar la capacidad de deducir perfiles correctos de los contribuyentes	> 2 series de distintos ratios (≈ 11 ratios por serie)
Rango *input* ADN$_t$ = __ - __	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 *input* de ADN total de las mezclas con muestras conocidas para observar la coherencia entre los *loci* y evaluar la capacidad de deducir perfiles correctos de los contribuyentes	> 2 series de distintos *input's* de ADN (5-6 *input's* de ADN por serie)

(modificado de SWGDAM, 2010; Butler, 2010a)

Estructura: APARTADOS

0. Validación de **Umbrales de Decisión**
1. Asignación de Alelos
2. Confirmación de un Perfil Mezcla
3. Número de contribuyentes
4. Aproximación a la Estima en la Proporción de los Contribuyentes
5. Criterios a valorar en "categorización" y "toma de decisiones"
6. Categorización de la mezcla
7. Toma de decisiones
8. Análisis estadístico

* Referencias y Glosario

1. Asignación de Alelos

En fase de edición >> configurar software

1.1. Picos en posición no *stutter*

> UA y no atribuibles a artefactos

1.2. Picos en posición *stutter*

1.2.1. > US ⟹ Alelo real

1.2.2. < US ⟹ Alelo "potencial"

1.2.3. Precaución!! picos entre alelos reales ⟹ efectos aditivos *+/- stutter*

Ejemplos de EPGs realizados mediante la plantilla: ***EPG-Maker(SPMv.3,Dec2-2011).xlt***

Estructura: APARTADOS

0. Validación de **Umbrales de Decisión**
1. Asignación de Alelos
2. Confirmación de un Perfil Mezcla
3. Número de contribuyentes
4. Aproximación a la Estima en la Proporción de los Contribuyentes
5. Criterios a valorar en "categorización" y "toma de decisiones"
6. Categorización de la mezcla
7. Toma de decisiones
8. Análisis estadístico

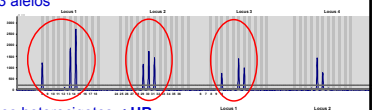
* Referencias y Glosario

2. Confirmación de un Perfil Mezcla

Cada laboratorio determinará los criterios mínimos. (Clayton et al., 1998; Gill et al., 2006)

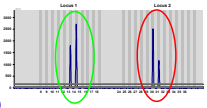
2.1. Nº mínimo de loci con ≥ 3 alelos

p.ej. > 2 loci con ≥ 3 alelos



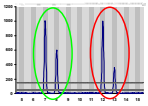
2.2. Balance de altura de alelos heterocigotos < **UB**

p.ej. < 50%



2.3. Desbalanceo amelogenina (mezcla mujer:varón)

p.ej. < 40%



EPG-Maker(SPMv.3,Dec2-2011).xlt

Estructura: APARTADOS

0. Validación de **Umbrales de Decisión**
1. Asignación de Alelos
2. Confirmación de un Perfil Mezcla
3. Número de contribuyentes
4. Aproximación a la Estima en la Proporción de los Contribuyentes
5. Criterios a valorar en "categorización" y "toma de decisiones"
6. Categorización de la mezcla
7. Toma de decisiones
8. Análisis estadístico

* Referencias y Glosario

3. Número de contribuyentes

3.1. Establecer líneas para estima nº mínimo de individuos

* ~~Picos > UE~~ * Picos > UA

3.2. Locus con > nº alelos ⟹ nº mínimos de contribuyentes

p.ej. 5 alelos → ≥ 3 contribuyentes

3.3. Recomendación: nº max. contribuyentes ⟹ ni valorar ni emitir conclusiones

p.ej. CODIS no mezclas de > 3 contribuyentes

3.4. Mezclas 2 contribuyentes ⟹ establecer proporción máxima

* Dependiente de calidad del perfil

3.5. Puntos 3.3 y 3.4, refrendado en validación interna (punto 0.5)

p.ej. Decisiones del tipo: *El laboratorio valorará estadísticamente mezclas que tengan como máximo **n** contribuyentes en proporción **1:x** o inferior.*

Estructura: APARTADOS

0. Validación de **Umbrales de Decisión**
1. Asignación de Alelos
2. Confirmación de un Perfil Mezcla
3. Número de contribuyentes
4. Aproximación a la Estima en la Proporción de los Contribuyentes
5. Criterios a valorar en "categorización" y "toma de decisiones"
6. Categorización de la mezcla
7. Toma de decisiones
8. Análisis estadístico

* Referencias y Glosario

4. Aproximación a la Estima en la Proporción de los Contribuyentes

Recomendación: cuando sea posible, establecer proporción contribuyentes.

Pautas, mezclas 2 contribuyentes:

4.1. *Loci* con alelos no compartidos entre contribuyentes

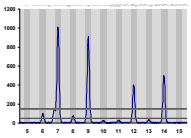
4.2. Determinar método de cálculo:

4.2.1. Locus 4 alelos: $\frac{A_A + A_B}{A_a + A_b}$

4.2.2. Mx (Gill et al. 1998; Gill et al., 2006 – ISFG) "minimos cuadrados" (Bill et al., 2004)

4.3. Valorarse: efecto sumatorio bandas *stutter*

4.4. Precaución: signos evidente de degradación



1000 + 900 / 400 + 500 = 2.1
2:1

Mx = (400+500)/(1000+900+400+500) = 0.32
0.68 / 0.32 = 2.1
2:1

EPG-Maker(SPMv.3,Dec2-2011).xlt

Estructura: APARTADOS

0. Validación de **Umbrales de Decisión**
1. Asignación de Alelos
2. Confirmación de un Perfil Mezcla
3. Número de contribuyentes
4. Aproximación a la Estima en la Proporción de los Contribuyentes
5. Criterios a valorar en "categorización" y "toma de decisiones"
6. Categorización de la mezcla
7. Toma de decisiones
8. Análisis estadístico

* Referencias y Glosario

5. Criterios a valorar en "categorización" y "toma de decisiones"

5.1. Ratio contribuyentes (punto 3.4.) ⇨ por encima, imposible definir perfil mezcla

5.2. Según contexto caso qué interesa: Componente minoritario, mayoritario, ambos

5.3. Criterio separación componentes

5.3.1. Ratio entre alelos > (n+1):1 (Luque, 2012)

5.3.2. Casos sólo > 8:1 (Luque, 2012)

5.4. Determinar nº max. contribuyentes para emitir conclusiones (punto 3.3.)

5.4.1. > nº contribuyentes → > dificultad interpretativa

5.5. Establecer nº min. *loci* (sin AMEL) ⇨ categorizar mezclas

p.ej. > **10** ***loci*** → incluir/excluir y valoración estadística
5-9 ***loci*** → excluir y no valoración estadística
< 5 ***loci*** → ni excluir/incluir ni valoración estadística

5.5.1. Establecer **min** RFUs (>UE ó >UA) y **max** RFUs (Límite Linealidad –Butler, 2010b-)

5.6. Guía para determinar conveniencia de perfiles "complejos" (SWGDAM, 2010)

5.7. Elaboración de fórmulas verbales ⇨ distintas circunstancias perfiles mezcla

Estructura: APARTADOS

0. Validación de **Umbrales de Decisión**
1. Asignación de Alelos
2. Confirmación de un Perfil Mezcla
3. Número de contribuyentes
4. Aproximación a la Estima en la Proporción de los Contribuyentes
5. Criterios a valorar en "categorización" y "toma de decisiones"
6. Categorización de la mezcla
7. Toma de decisiones
8. Análisis estadístico

* Referencias y Glosario

6. Categorización de la mezcla (1)

Permitirá una adecuada toma de decisiones (punto 7)

Propuesta, basada en bibliografía (Schneider et al., 2009; SWGDAM, 2010; Gill, 2011; Luque, 2012; Meulenbroek et al., 2011; Benschop et al., 2012)

6.1. Tipo A: contribuyentes indistinguibles

6.2. Tipo B: componentes mayoritario y minorita guibles
Componente mayoritario "separable

6.2.1. Tipo B.1: componente mayoritario, o

6.2.2. Tipo B.2: componente mayoritario, origen múltip
Perfil mayoritario mezcla, valorable cc

6.2.3. Tipo B.3: interesa componente minoritario
Valorar el conjunto como mezcla *Tip*
Nunca superar nº max. contribuyente

6. Categorización de la mezcla (2)

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

- Mezclas a partir de muestras con LT-DNA
- Mezclas con un componente incompleto

Descartados *loci* que no cumplen criterios (punto 5.5), re-catalogación:

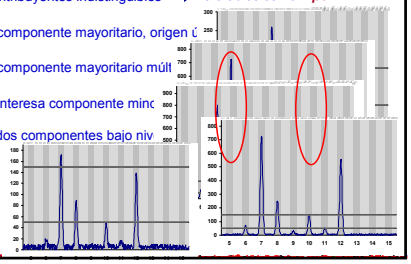
6.3.1. Tipo CA: contribuyentes indistinguibles ⟹ valorables como ***Tipo A***

6.3.2. Tipo CB.1: componente mayoritario, origen ú

6.3.3. Tipo CB.2: componente mayoritario múlt

6.3.4. Tipo CB.3: interesa componente minc

6.3.5. Tipo CC: todos componentes bajo niv



Estructura: APARTADOS

0. Validación de **Umbrales de Decisión**
1. Asignación de Alelos
2. Confirmación de un Perfil Mezcla
3. Número de contribuyentes
4. Aproximación a la Estima en la Proporción de los Contribuyentes
5. Criterios a valorar en "categorización" y "toma de decisiones"
6. Categorización de la mezcla
7. Toma de decisiones
8. Análisis estadístico

* Referencias y Glosario

7. Toma de decisiones

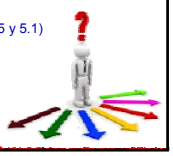
En base: criterios (punto 5), validación parámetros (punto 0), categorización mezcla (punto 6):

7.1. Tipos A, **B.2**, **CA**, **CB.2:** contribuyentes indistinguibles y/o no separables
- No supere nº max contribuyentes (punto 5.4)
- Inclusión / Exclusión
- Inclusión → tratamiento estadístico (punto 8)

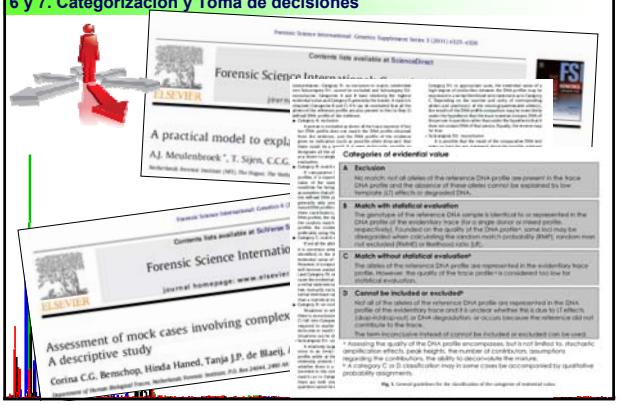
7.2. Tipos B.1 y **CB.1:** interesa componente mayoritario, origen único
- Indicar que es un componente mayoritario + componente minoritario
- Inclusión / Exclusión
- Inclusión → tratamiento estadístico (punto 8)

7.3. Tipos B.3 y **CB.3:** interesa componente no mayoritario ⟹ valorables como ***Tipo A***
- No supere nº max contribuyentes (punto 5.4)
- No supere umbral "ratio contribuyentes" valorable (punto 0.5 y 5.1)
  → Exclusión / Inclusión y cálculos estadísticos
- Supere ratio → sólo Exclusión

7.4. Tipos CC: efectos estocásticos o mayoría loci < UE
- Perfiles **no concluyentes**



6 y 7. Categorización y Toma de decisiones



Estructura: APARTADOS

0. Validación de **Umbrales de Decisión**
1. Asignación de Alelos
2. Confirmación de un Perfil Mezcla
3. Número de contribuyentes
4. Aproximación a la Estima en la Proporción de los Contribuyentes
5. Criterios a valorar en "categorización" y "toma de decisiones"
6. Categorización de la mezcla
7. Toma de decisiones
8. Análisis estadístico

* Referencias y Glosario

8. Análisis estadístico (1)

Análisis estadísticos probabilísticos → recomendaciones **ISFG** (Gill et al. 2006)

8.1. ***Recomendación 1*** de la **ISFG:**
"Para perfiles mezcla el LR es la aproximación estadística más adecuada"

8.1.1. Se desaconseja otra aproximación, pero en caso de usarla

"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. ***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 et al. (1991) y Weir et al. (1997)."

8.3. ***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)."

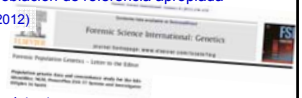
8.4. Se recomienda establecer claramente las hipótesis, para el cálculo final del:

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

8. Análisis estadístico (2)

8.5. Uso de frecuencias alélicas de la población de referencia apropiada

8.5.1. Caso de España: García et al. (2012)



8.6. Revisión de las recomendaciones existentes

ISFG (Gill et al., 2006), comisiones Gran Bretaña (Gill et al., 2009), Alemania (Schneider et al., 2009) y Australia (Stringer et al., 2009)

Continua actualización de la literatura existente sobre el tema

8.7. Plasmar de modo **claro** y **conciso** las hipótesis empleadas en informes

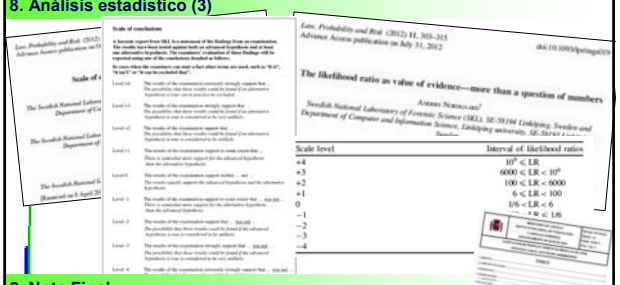
Conclusiones: explicaciones oportunas del valor del LR

"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. Se desaconseja el uso de ***predicados verbales***

"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, …."

8. Análisis estadístico (3)



9. Nota Final

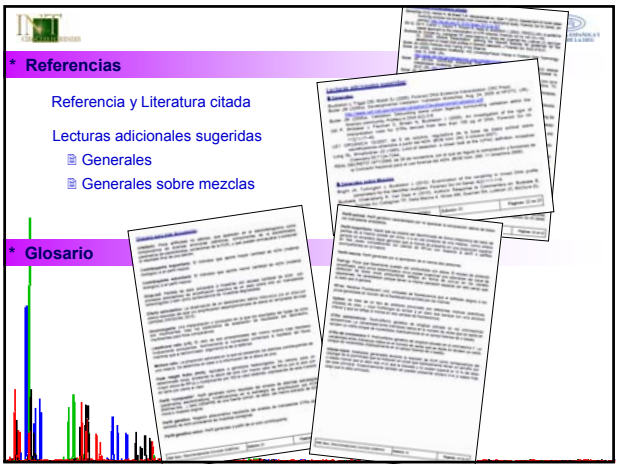
A partir de criterios mínimos establecidos (puntos 1-8) y valida)

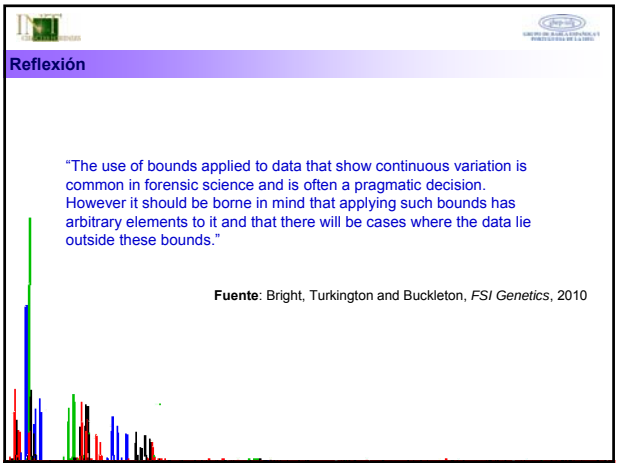
Recomendación ⟹ elaboración de documento o **PNT**

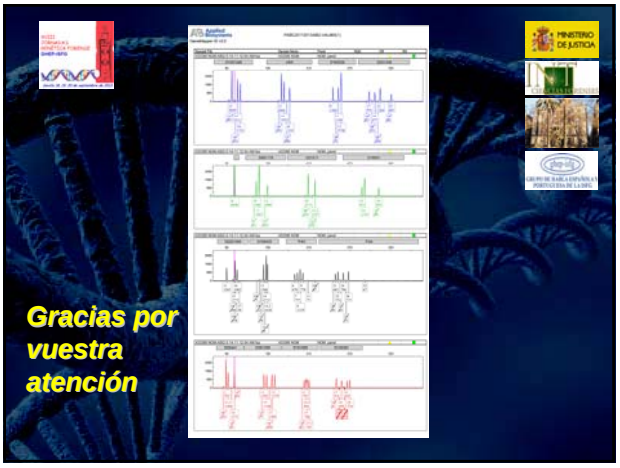
Estructura: APARTADOS

0. Validación de **Umbrales de Decisión**
1. Asignación de Alelos
2. Confirmación de un Perfil Mezcla
3. Número de contribuyentes
4. Aproximación a la Estima en la Proporción de los Contribuyentes
5. Criterios a valorar en "categorización" y "toma de decisiones"
6. Categorización de la mezcla
7. Toma de decisiones
8. Análisis estadístico

* Referencias y Glosario


* Referencias
Referencia y Literatura citada
Lecturas adicionales sugeridas
Generales
Generales sobre mezclas
* Glosario


Reflexión
"The use of bounds applied to data that show continuous variation is common in forensic science and is often a pragmatic decision. However it should be borne in mind that applying such bounds has arbitrary elements to it and that there will be cases where the data lie outside these bounds."
Fuente: Bright, Turkington and Buckleton, *FSI Genetics*, 2010


MINISTERIO DE JUSTICIA
Gracias por vuestra atención