



## RECOMENDACIONES PARA LA VALIDACIÓN Y ANÁLISIS DE PERFILES MEZCLA DE MARCADORES STR AUTOSOMICOS DEL ADN EN GENETICA FORENSE

El análisis y la interpretación de perfiles de ADN mediante el empleo de marcadores STR han experimentado un notable nivel de estandarización técnica. Distintas instituciones y organismos internacionales trabajan con ese objetivo, dictando recomendaciones y guías que sin duda constituyen un elemento fundamental en la labor diaria de los laboratorios forenses. Gran parte de dichos estándares técnicos han sido recogidos por parte de esta Comisión Técnica en un documento previo.

[https://www.administraciondejusticia.gob.es/paj/PA\\_WebApp\\_SGNTJ\\_NPAJ/descarga/Memoria\\_ADN.pdf?idFile=799b00f0-33d2-482c-8b66-f38c78c99f5f](https://www.administraciondejusticia.gob.es/paj/PA_WebApp_SGNTJ_NPAJ/descarga/Memoria_ADN.pdf?idFile=799b00f0-33d2-482c-8b66-f38c78c99f5f)

Sin embargo, aún hoy, existen algunas facetas del análisis genético en el ámbito forense que siguen resultando un auténtico reto para la comunidad forense. Una de ellas es, sin duda, la interpretación y valoración de los perfiles mezcla de STR autosómicos. Distintos grupos de trabajo científico y grupos de estandarización han editado recomendaciones y guías para abordar el análisis y valoración de este tipo de perfiles. Entre éstas se señalan las emitidas por:

- *International Society for Forensic Genetics (ISFG)*

[http://www.isfg.org/files/bed71eb962fcf9d28be21f05da7e50e0288cbf2c\\_fsi2006-160-90.pdf](http://www.isfg.org/files/bed71eb962fcf9d28be21f05da7e50e0288cbf2c_fsi2006-160-90.pdf)

[http://www.isfg.org/files/cec88e43ce86f7a9511b96b56383d8a701429f13.fsigen2012\\_gill\\_recommendations.pdf](http://www.isfg.org/files/cec88e43ce86f7a9511b96b56383d8a701429f13.fsigen2012_gill_recommendations.pdf)

- *Scientific Working Group DNA Analysis Methods (SWGDM)*

[http://www.swgdam.org/Interpretation\\_Guidelines\\_January\\_2010.pdf](http://www.swgdam.org/Interpretation_Guidelines_January_2010.pdf)

- *Technical UK DNA Working Group*

[http://www.fsigenetics.com/article/S1872-4973\(07\)00115-9/abstract](http://www.fsigenetics.com/article/S1872-4973(07)00115-9/abstract)

- *German Stain Commission*

[http://www.gednap.forensischegenetik.de/GEDNAP\\_en/Information/MixedStainsSCre c.pdf](http://www.gednap.forensischegenetik.de/GEDNAP_en/Information/MixedStainsSCre c.pdf)

- *National Institute of Standards and Technology (NIST)*

MINISTERIO  
DE JUSTICIA

<http://www.cstl.nist.gov/strbase/mixture.htm>

Establecer una guía única para interpretación de perfiles mezcla no es una labor fácil. La metodología del laboratorio, los equipos y *kits* empleados, los programas informáticos utilizados, así como la toma de decisiones reflejada en los procedimientos de trabajo del propio laboratorio hacen que la interpretación de un perfil mezcla pueda ser realizada de diferente forma. Distintos ejercicios organizados desde el Grupo de habla española y portuguesa de la ISFG (GHEP-ISFG) ponen de manifiesto la variabilidad de resultados que distintos laboratorios obtienen al interpretar los mismos perfiles mezcla.

<http://www.gep-isfg.org/es/comisiones-trabajo/ejercicio-colaborativo-ghepmix-2009/>  
<http://www.gep-isfg.org/es/comisiones-trabajo/ejercicio-colaborativo-ghepmix-2010/>  
<http://www.gep-isfg.org/es/comisiones-trabajo/ejercicio-colaborativo-ghepmix-2011/>

Pese a esta dificultad, se considera que sí es posible fijar unos criterios como requisitos mínimos para su interpretación. Las distintas guías y recomendaciones insisten en esta necesidad. Ello permitirá establecer unos límites de calidad en la aceptación de perfiles mezcla, así como la definición de unos criterios únicos y objetivos dentro del propio laboratorio que ayudarán a la estandarización.

Siguiendo la línea de otros grupos científicos europeos, el presente documento tiene como finalidad establecer unas recomendaciones básicas y generales para la interpretación de perfiles mezcla obtenidos mediante marcadores STR autosómicos. No se trata de un documento estático, ya que los cambios y avances permanentes en este campo obligara sin duda a realizar adaptaciones del mismo. Junto a él se aportan dos anexos: el Anexo I recoge un listado detallado de bibliografía donde se desarrollan aspectos relacionados con el análisis, valoración, validación e interpretación de perfiles mezcla de ADN; por su parte, el Anexo II describe algunos términos que pueden resultar necesarios para complementar este documento.



## Recomendación 1: Acreditación y garantía de calidad

Los laboratorios que en su casuística llevan a cabo la interpretación de perfiles genéticos mezcla deben considerar que tanto el método de análisis de fragmentos de ADN empleado para la detección de la mezcla como el procedimiento utilizado para la interpretación de dicho tipo de perfiles, estén acreditados bajo la Norma ISO/IEC 17025 por parte de la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC).

Como parte de las actividades encaminadas al aseguramiento de la calidad, tal y como se describe en la norma UNE-EN-ISO 17025, el laboratorio debería participar en ejercicios de intercomparación que permitan chequear sus procedimientos y sistemática de trabajo en el tratamiento y valoración de perfiles mezcla. Los ejercicios organizados por el GHEP- ISFG y el GEDNAP incluyen muestras con perfiles mezclas. Aquellos laboratorios que en su casuística diaria lleven a cabo el análisis de este tipo de perfiles mezcla deberán participar satisfactoriamente en el análisis e interpretación este tipo de muestras.

Asimismo, el personal encargado de llevar a cabo la valoración e interpretación de perfiles genéticos mezcla debe estar debidamente formado y tener un amplio conocimiento del comportamiento de los artefactos, así como de los procedimientos a aplicar, estrategias de análisis a emplear, guías y recomendaciones existentes y valoración estadística de los resultados.

## Recomendación 2: Validación interna

El laboratorio debe llevar a cabo una validación interna del método empleado para realizar la asignación alélica, orientada a establecer los valores umbrales para una serie de parámetros que le sirvan de referencia y que le permitirán a su vez definir criterios objetivos para emitir conclusiones y tomar decisiones sobre la valoración final de un perfil mezcla.

De forma general, en materia de validación de métodos para análisis de perfiles genéticos, distintos grupos científicos han editado guías que abordan algunas de las necesidades en esta materia y que pueden servir de base a los laboratorios para llevar a cabo su propia validación:

- *European Network Forensic Science Institutes (ENFSI)*

[http://www.enfsi.eu/sites/default/files/documents/minimum\\_validation\\_guidelines\\_in\\_dna\\_profiling\\_-\\_v2010\\_0.pdf](http://www.enfsi.eu/sites/default/files/documents/minimum_validation_guidelines_in_dna_profiling_-_v2010_0.pdf)

- *SWGDM*

[http://swgdam.org/SWGDAM\\_Validation\\_Guidelines\\_APPROVED\\_Dec\\_2012.pdf](http://swgdam.org/SWGDAM_Validation_Guidelines_APPROVED_Dec_2012.pdf)



- *DNA Advisory Board (DAB)*

<http://www.fbi.gov/about-us/lab/forensic-science-communications/fsc/july2000/codis2a.htm>

Por su parte, más específicamente referido al proceso de validación del método empleado para el análisis de perfiles mezclas, resulta recomendable lo descrito también por el NIST <http://www.cstl.nist.gov/strbase/validation.htm>

Al menos, entre esos parámetros debe incluirse:

- o *Umbral analítico (Analytical Threshold, AT)*

Es el valor (en RFUs) que al laboratorio le genera la confianza suficiente para asegurar que cualquier pico dado por encima de ese umbral no es atribuible al ruido de fondo. Los picos observados por encima de dicho valor serán atribuibles a alelos reales, una vez descartados los distintos tipos de artefactos.

- o *Umbral estocástico (Stochastic Threshold, ST)*

Este umbral ofrece al laboratorio confianza ante los efectos estocásticos que pueden producirse bien como consecuencia de la deficiente cantidad y/o calidad del material genético aportado por alguno/s contribuyente/s de la mezcla, bien debido a la presencia de inhibidores, o a fenómenos asociados a la degradación de la muestra y a la escasa cantidad de ADN presente en la misma. Este umbral orienta al laboratorio sobre el valor por encima del cual es razonable admitir que no ha existido pérdida alélica. En el caso de interpretación de mezclas debe considerarse el efecto aditivo que se puede producir por el solapamiento de alelos.

- o *Umbral de stutter (Stutter Threshold)*

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. Este umbral, estimado en porcentaje (%) respecto al alelo principal, orientará sobre el valor de altura de pico (en RFU) por encima del cual es razonable categorizar un determinado pico como alelo y no como *stutter*. En caso contrario, es decir, un valor de altura de un pico en posición *stutter* por debajo del umbral de *stutter* aceptado, deberá ser sometido a consideración por parte del laboratorio en función de la valoración conjunta del perfil genético, así como de los antecedentes del propio caso.

- o *Equilibrio de heterocigotos (Peak Height Ratio)*

El laboratorio debe estimar, mediante validación interna de sus métodos de análisis y detección de fragmentos de ADN, la proporción (*ratio*) entre las alturas correspondientes a los picos alélicos de marcadores en heterocigosis. A la vista de esos datos debe establecerse un umbral por debajo del cual debería considerarse, a la vista del resto de marcadores genéticos analizados y de la valoración de otros parámetros, la posibilidad de estar ante un perfil mezcla.



En ocasiones los laboratorios modifican su procedimiento de análisis ya sea con cambios en los parámetros instrumentales de análisis y detección, empleo de otros marcadores o kits diferentes a los usados habitualmente, cambios en el *software* de análisis las estrategias de amplificación. La complejidad interpretativa de algunos tipos de perfiles mezcla recomienda que, cuando estas implementaciones se llevan a cabo, los laboratorios consideren la necesidad de una validación abundando en aquellos parámetros que pudieran verse afectados o alterados por dichos cambios.

### **Recomendación 3: Controles anticontaminación y caracterización del efecto drop-in**

Algunos perfiles mezcla presentan una especial complejidad, es el caso de aquellos en los que alguno de sus componentes se encuentra cercano a los límites de detección de los equipos del laboratorio (*low level DNA, low template DNA*). A menudo, estos perfiles están sometidos a efectos estocásticos, resultando en pérdidas alélicas (*drop-out*) o falsas ganancias alélicas (*drop in*). En estos casos la eficacia del análisis se ve reducida y aumenta la variabilidad de resultados por efecto del azar.

El uso de controles negativos es especialmente necesario en el análisis de perfiles mezcla donde se sospecha la existencia de algún componente en cantidades sub-óptimas de ADN. Esto permite detectar ciertos tipos de contaminación y evitar así resultados no fiables.

Es también muy importante usar una base de datos con los perfiles genéticos de las personas implicadas en alguna de las fases del análisis con el fin de compararlos con los perfiles genéticos obtenidos en las mezclas y de esta manera poder descartar que éstos se hayan producido artificialmente en el propio laboratorio.

La calidad de los consumibles empleados en el laboratorio es también un punto crítico ya que este material puede ser fuente de contaminación. Se recomienda el empleo de material fungible libre de ADN.

Por último, es recomendable que el laboratorio estime el nivel de drop-in en sus análisis. Éste se puede estimar a partir de la frecuencia con la que aparecen alelos espurios en los controles negativos de extracción [Gill et al., 2000].

Estos aspectos quedan recogidos detalladamente en el documento editado por ENFSI:

[http://www.enfsi.eu/sites/default/files/documents/dna\\_contamination\\_prevention\\_guidelines\\_for\\_the\\_file\\_contamination\\_prevention\\_final\\_-\\_v2010\\_0.pdf](http://www.enfsi.eu/sites/default/files/documents/dna_contamination_prevention_guidelines_for_the_file_contamination_prevention_final_-_v2010_0.pdf)



#### **Recomendación 4: Sobre el análisis e interpretación del perfil genético**

La toma de decisiones sobre un determinado perfil mezcla obliga inicialmente a la definición, hasta donde sea posible, del perfil analizado. Es recomendable que el laboratorio establezca una categorización de los perfiles mezcla, y que en base a ello se pueda clasificar el perfil sometido a análisis. Atendiendo a los umbrales establecidos para los parámetros validados (Recomendación 2), el laboratorio debería recoger en un procedimiento normalizado de trabajo los pasos a seguir para poder definir la categoría del perfil y la posterior interpretación del mismo. Se recomienda el seguimiento de lo descrito en este sentido por la ISFG.

[http://www.isfg.org/files/bed71eb962fcf9d28be21f05da7e50e0288cbf2c\\_fsi2006-160-90.pdf](http://www.isfg.org/files/bed71eb962fcf9d28be21f05da7e50e0288cbf2c_fsi2006-160-90.pdf)

En el contexto de la casuística y a efectos confirmativos, es recomendable que el laboratorio valore la reproducibilidad y repetibilidad de sus resultados cuando sea posible y la complejidad del perfil mezcla lo aconseje.

En la interpretación y valoración del perfil genético, y especialmente, en el caso de perfiles mezcla el laboratorio debe considerar de forma conjunta diferentes hallazgos e información derivada de otros análisis efectuados sobre la muestra, tales como pruebas preliminares que pueden orientar sobre la naturaleza de los fluidos constituyentes, análisis microscópico y la cuantificación de ADN. Esta valoración cobra especial importancia cuando el perfil mezcla procede de una agresión sexual ya que en estas situaciones aparecen nuevas variables que pueden tener gran trascendencia en la valoración e interpretación final del perfil mezcla (p ej: individuos vasectomizados o azoospermicos).

Se recomienda el empleo de marcadores STRs autosómicos para llevar a cabo el análisis de los perfiles mezcla, por su parte el uso del análisis de ADN mitocondrial (ADNmt) no es recomendado, ya que distintos factores como la proporción de los contribuyentes, tipos de fluidos constituyentes de la mezcla o la metodología empleada pueden generar errores en la interpretación final del resultado.

Especial recomendación hacia el empleo de marcadores STRs de cromosoma Y en aquellas situaciones con mezclas donde se espera la presencia de componentes de procedencia masculina y femenina.

#### **Recomendación 5: Edición independiente**

El laboratorio debe garantizar la objetividad en la valoración final de un perfil genético y en concreto de un perfil mezcla. En este sentido, se recomienda que la valoración del perfil mezcla se lleve a cabo de forma independiente sin que se vea influenciada por el conocimiento de los perfiles genéticos de las muestras indubitadas con las que interese cotejar dicho perfil.



El laboratorio debe establecer, mediante procedimientos de trabajo, los medios encaminados a garantizar la valoración del perfil mezcla de manera independiente al conocimiento y la valoración del perfil genético obtenido para otras muestras del caso así como de las muestras de referencia sometidas a cotejo. Por tanto, el conocimiento del perfil genético de otras muestras del caso y/o muestras de referencia no debe influir en la definición del perfil mezcla problema.

De la misma manera, y hasta donde sea posible, la valoración del perfil no debe verse influenciada por el conocimiento por parte del analista de datos que no sean trascendentes para llevar a cabo dicha valoración (p.ej.: declaraciones de testigos, motivos o historial del sospechoso, la declaración del sospechoso...).

### **Recomendación 6: Valoración estadística del perfil mezcla**

Cuando atendiendo a los criterios establecidos por el laboratorio, se plantea una situación de compatibilidad (completa o parcial), entre la/s muestra/s de referencia y el perfil mezcla objeto de estudio, es necesario llevar a cabo una valoración estadística de dicha compatibilidad que debería incluirse en el dictamen pericial. Los dos parámetros que los laboratorios forenses suelen emplear son la probabilidad de inclusión (RMNE –*random–man not excluded*-) o el cálculo del coeficiente de verosimilitud (LR –*likelihood ratio*-).

Siguiendo las recomendaciones de la *International Society for Forensic Genetic* (ISFG) el método recomendado es el uso del coeficiente de verosimilitud (LR). Para su cálculo se aconseja el empleo de las fórmulas descritas por Evett y cols (1991) y, Weir y cols (1997). Esta aproximación estadística permite valorar de forma conjunta las hipótesis planteadas por las partes implicadas en el proceso judicial (fiscal y defensa). Asimismo, en el dictamen será necesario reflejar las hipótesis empleadas para llevar a cabo el cálculo estadístico del LR. El laboratorio debe considerar la posibilidad de que en determinadas ocasiones, a requerimiento de algunas de las partes y en función de los antecedentes del caso, puede ser necesario el cálculo de más de un LR planteando diferentes parejas de hipótesis alternativas.

En el caso de perfiles mezcla donde se sospecha la presencia de efectos estocásticos que puedan dar lugar a fenómenos de drop-out y/o drop-in, el laboratorio puede valorar el empleo del cálculo del LR que incluye la estima de probabilidades de drop-out (Pr(D)) y drop-in (Pr(C)) según lo descrito en las recomendaciones de la ISFG (Gill et al .2012).

Para ayudar en la implementación de este modelo de cálculo probabilístico se han desarrollado herramientas informáticas accesibles a través del portal Web de la ISFG (<http://www.isfg.org/Software>) y se están desarrollando una serie de iniciativas de formación y entrenamiento en el marco del proyecto Eurofor gen subvencionado por el 7º Programa Marco de la Unión Europea (<http://www.eurofor gen.eu/>).

MINISTERIO  
DE JUSTICIA

El dato numérico obtenido para el valor del LR debe ser explicado, de forma sencilla y exacta en el cuerpo del dictamen pericial, de manera que el Tribunal pueda entender claramente el significado del dato estadístico obtenido.

Asimismo, en el dictamen debe reflejarse la base de datos poblacional empleada para realizar dicho tratamiento estadístico, así como las fórmulas y/o programas empleados. En los casos en los que se pretende valorar la evidencia en el contexto de la población española en general y con el fin de tender a la estandarización del valor del LR obtenido, se recomienda el uso de las frecuencias alélicas actualizadas de la población española que figuran en las publicaciones científicas de referencia de la CNUFADN.

[https://www.administraciondejusticia.gob.es/paj/publico/ciudadano/informacion\\_institucional/organismos/instituto\\_nacional\\_de\\_toxicologia\\_y\\_ciencias\\_forenses/cnadm/ctp](https://www.administraciondejusticia.gob.es/paj/publico/ciudadano/informacion_institucional/organismos/instituto_nacional_de_toxicologia_y_ciencias_forenses/cnadm/ctp)

#### **Recomendación 7: Expresión del resultado en el dictamen**

La expresión del resultado, así como las conclusiones que se derivan del mismo, en el cuerpo del dictamen pericial resulta de gran importancia.

En referencia a la expresión de los resultados y, cuando así lo establezcan los procedimientos del laboratorio, el perfil mezcla será recogido en forma de tabla en el dictamen, señalando en la misma (cuando proceda) aquel o aquellos marcadores genéticos para los cuales, atendiendo a los procedimientos del laboratorio, no es posible precisar la asignación alélica.