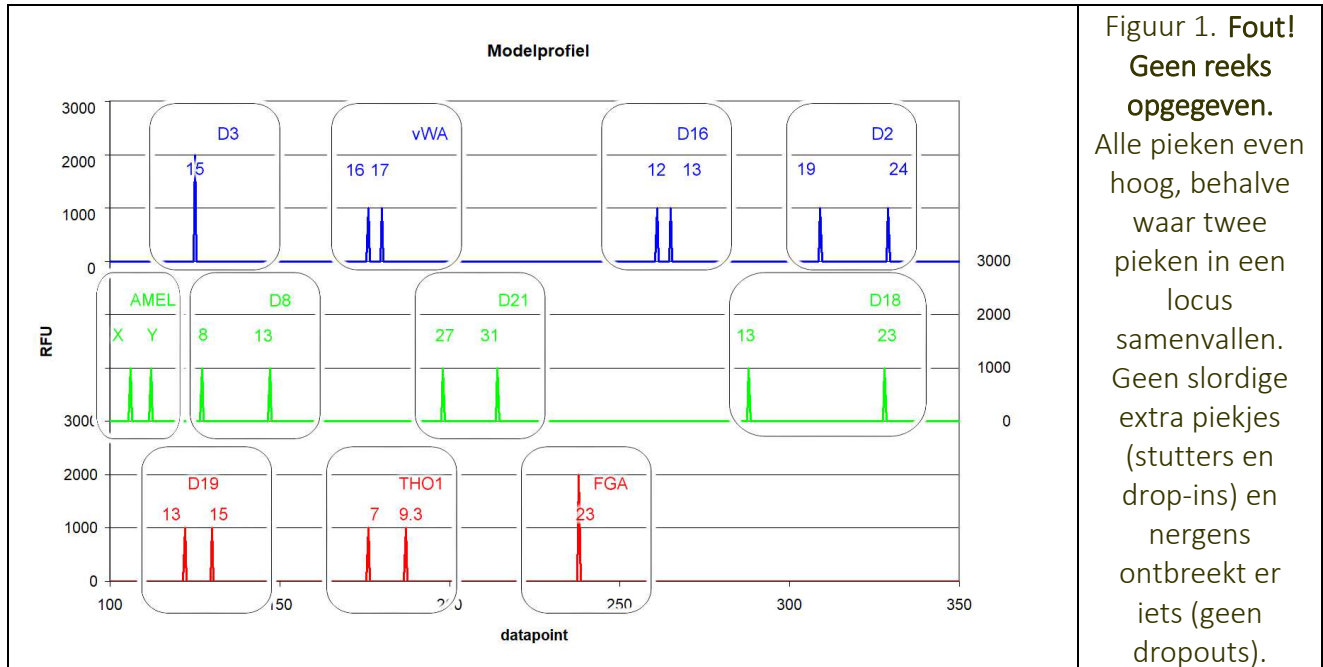


## Spoor #10 door de molen van EuroForMix en DNASTatistX

deemzet 28 juni 2022

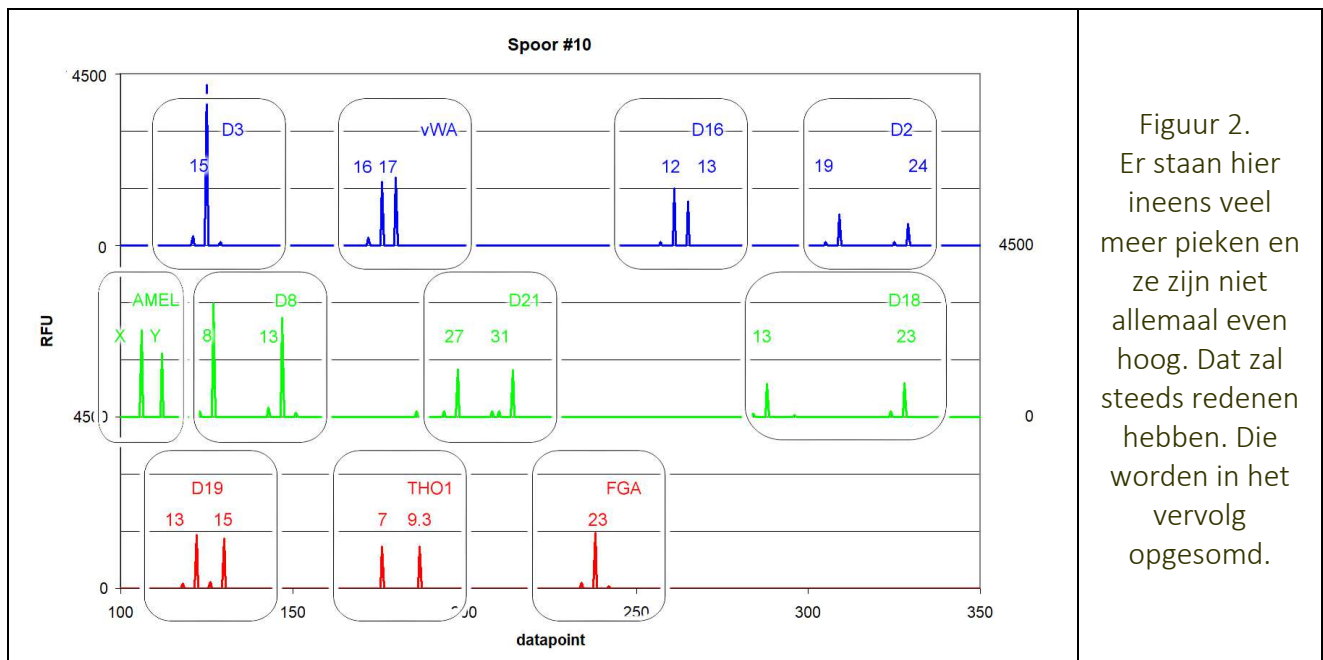
### Inleiding

Stel er ligt een profiel voor, waarop niets valt aan te merken, een enkelvoudig profiel. Hoe ziet dat er dan uit? Welnu bij voorbeeld zo:



Figuur 1. Fout!  
**Geen reeks opgegeven.**  
Alle pieken even hoog, behalve waar twee pieken in een locus samenvallen. Geen slordige extra piekjes (stutters en drop-ins) en nergens ontbreekt er iets (geen dropouts).

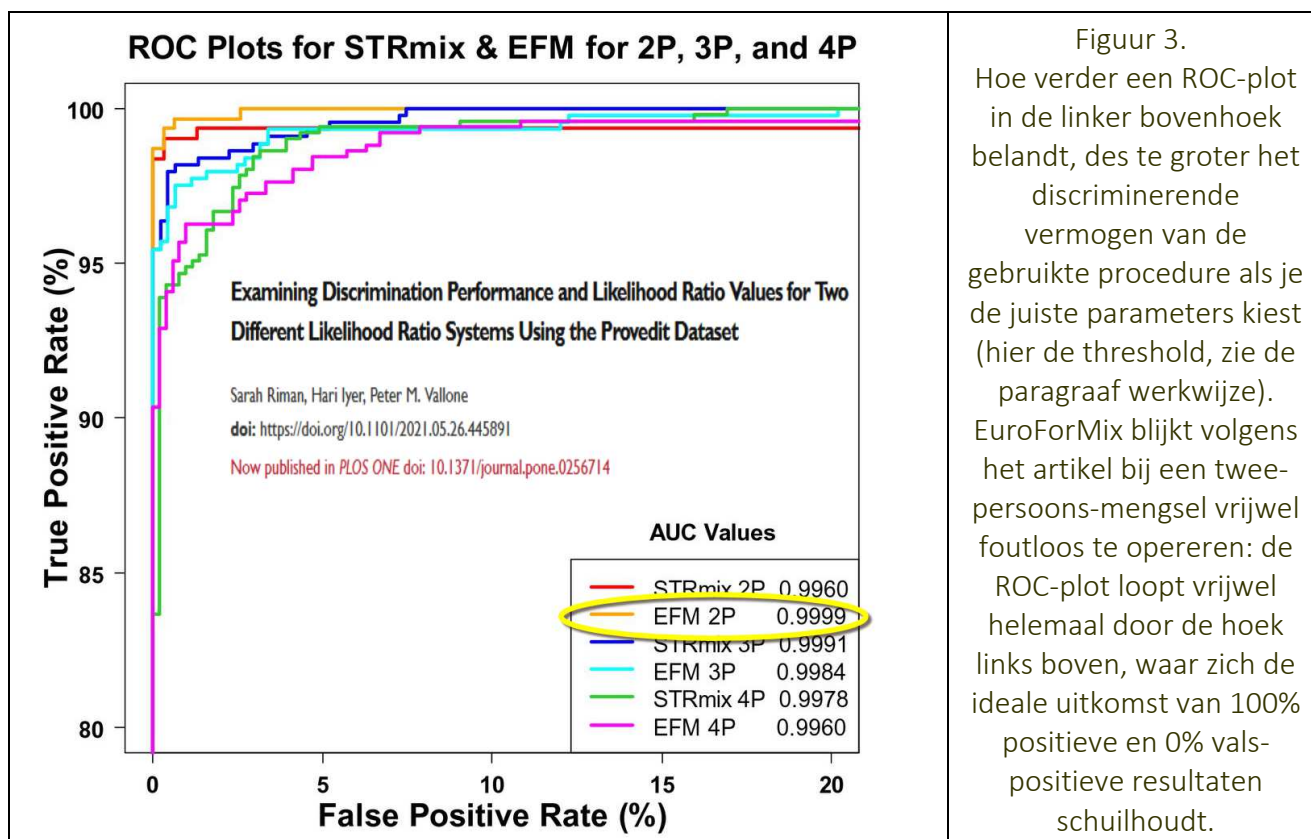
De werkelijkheid is altijd chaotischer. Is dit profiel gelijkwaardig aan het volgende? Volgens het NFI wel:



Figuur 2.  
Er staan hier ineens veel meer pieken en ze zijn niet allemaal even hoog. Dat zal steeds redenen hebben. Die worden in het vervolg opgesomd.

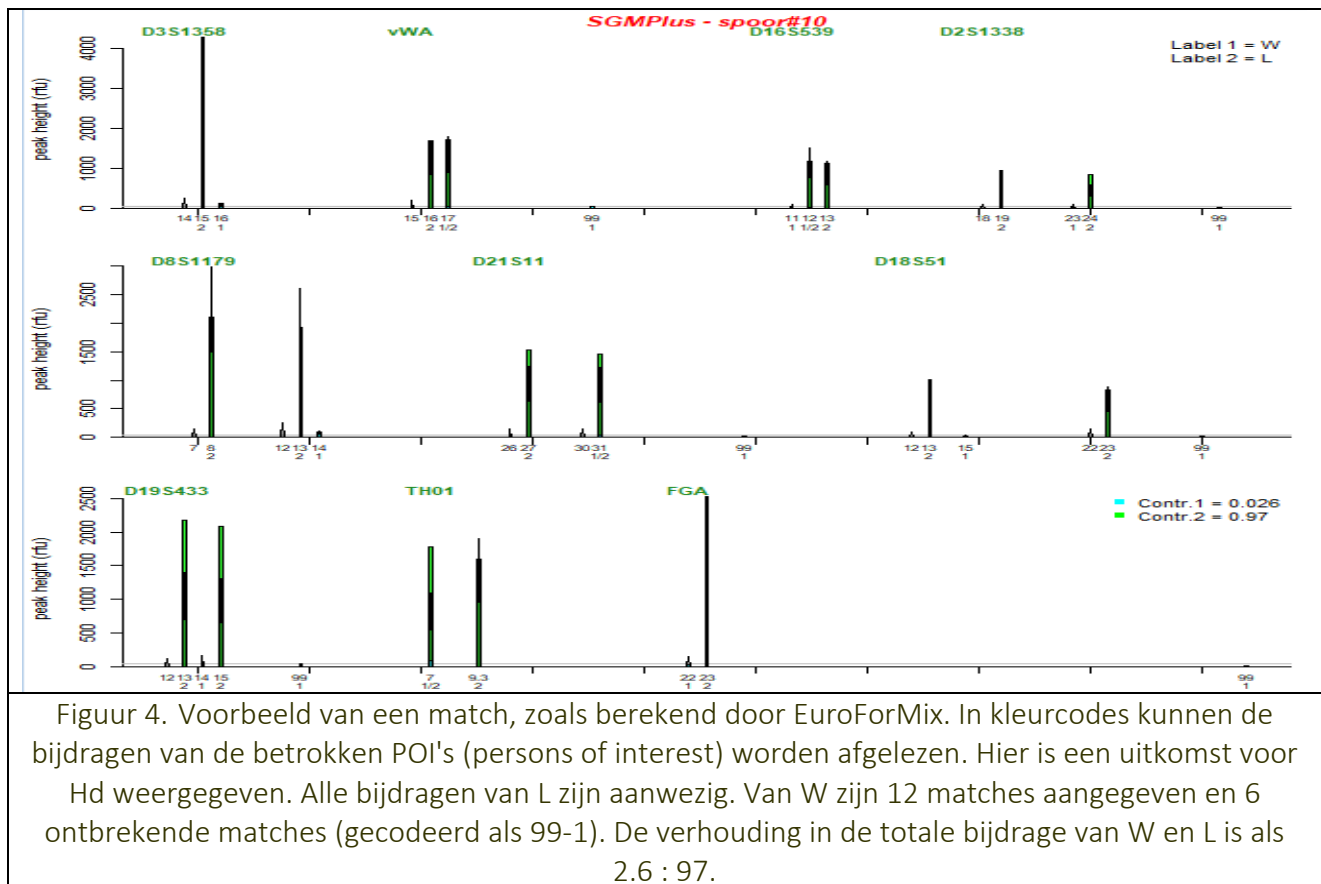
## Opzet

EuroForMix berekent de waarschijnlijkheid, dat uit het ideale profiel - met behulp van een aantal veronderstellingen - een profiel ontstaat dat precies lijkt op het profiel dat in het onderzoek is opgedoken. Waarbij dat profiel niet alleen moet kloppen met de STR-lengtes (weergegeven als datapoint) maar ook met de hoogtes van de corresponderende pieken (RFU's). Dat is het resultaat van een omslag in denken in de laatste decennia: van binaire analyse naar de continue analyse. Het nieuwe totaalbeeld ontstaat door toevoeging aan het modelprofiel van allerlei toevalligheden, die weer bepaalde (on-)waarschijnlijkheden vertegenwoordigen. Deze (on-)waarschijnlijkheden stapelen zich op waardoor de waarschijnlijkheid dat dit nieuwe gereconstrueerde profiel er nu juist precies zo uitziet als het waargenomen profiel uiteraard zeer klein is. De verschillende software-pakketten zijn diverse malen vergeleken en getest op hun discriminerend vermogen. Hieronder een sterk staaltje betreffende EuroForMix. Voor DNA-mengsels met bijdragen van twee individuen volgt de ROC-plot een bijna haaks patroon.



Figuur 3.  
Hoe verder een ROC-plot in de linker bovenhoek belandt, des te groter het discriminerende vermogen van de gebruikte procedure als je de juiste parameters kiest (hier de threshold, zie de paragraaf werkwijze). EuroForMix blijkt volgens het artikel bij een twee-persoons-mengsel vrijwel foutloos te opereren: de ROC-plot loopt vrijwel helemaal door de hoek links boven, waar zich de ideale uitkomst van 100% positieve en 0% vals-positieve resultaten schuilhoudt.

De berekening vindt op verzoek van de gebruiker van de software op twee manieren plaats. Eenmaal volgens de hypothese van de aanklager, de zogenaamde Hp, waarbij p voor *prosecution* staat. Hieronder is gekozen voor de stelling van het NFI (rapport 19 januari 2004), dat spoor #10 een enkelvoudig DNA-profiel van Louwes (L) voorstelt. En eenmaal volgens de hypothese van de verdediging, de zogenaamde Hd, met d voor *defence*. In dat kader is hier de hypothese gebruikt, dat spoor #10 bestaat uit DNA van Louwes en DNA van Wittenberg (W), een stelling die impliciet is ingenomen door Knoops in de vorige herzieningsaanvraag (herzieningsverzoek 26 juli 2006). In beide gevallen ontstaat een waarde voor de mate van waarschijnlijkheid waarmee het gemeten profiel kan worden nagebootst. Zo'n waarde heet een likelihood. De bedoeling is, dat we de twee likelihoods vervolgens met elkaar vergelijken: de likelihood ratio (LR).



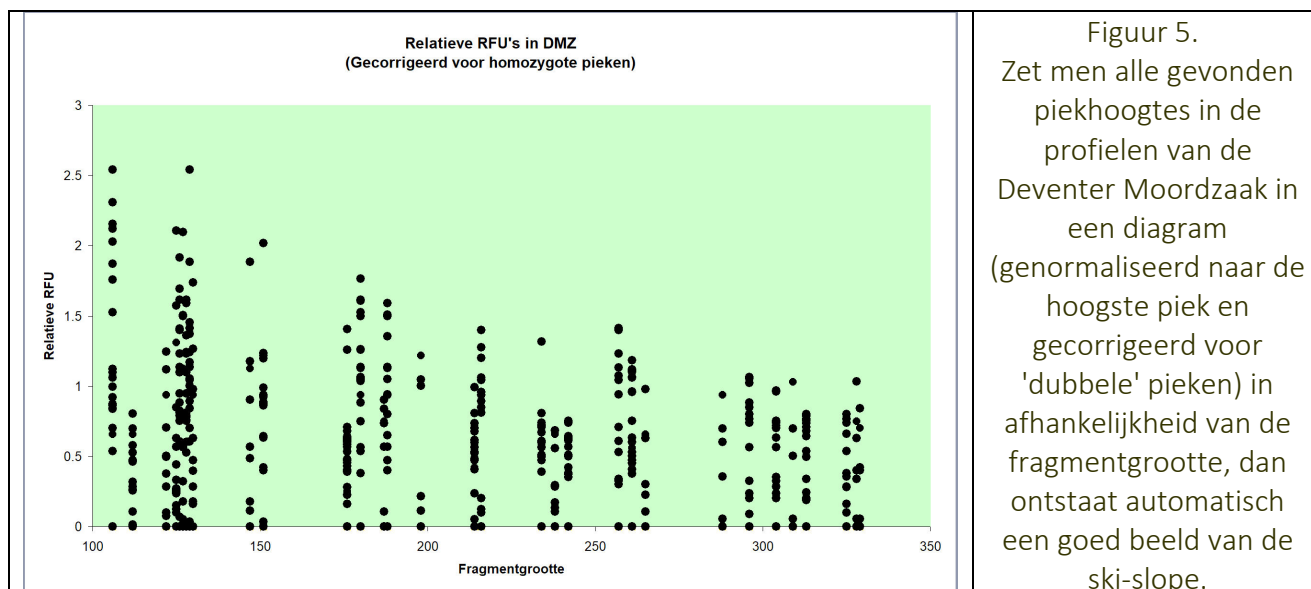
## Complicaties

Er zijn nogal wat omstandigheden die kunnen worden aangeroepen om het gevonden profiel met variabele piekhoogtes te kunnen verklaren, de volgende opsomming is wellicht nog steeds niet uitputtend:

- 1) Het DNA moet eerst worden losgemaakt uit het monster, liefst met zo min mogelijk verontreinigingen.
  - a) Tijdens de extractie van het DNA gaat DNA verloren, omdat niet alle chromosomen die onderzocht worden gelijk zijn; sommige zijn groter dan andere en wellicht zijn ze dan gemakkelijker of juist moeilijker los te weken uit het monster. Zo is het erkend moeilijk DNA-sporen los te weken van katoen (wattenstaafjes). Dat lijkt geen groot probleem, want dit geldt voor beide hypothesen.
  - b) Er bestaan meerdere zuiveringsmethodes. Van de twee in de Deventer Moordzaak gebruikte methodes is er één gericht op het verwijderen van de verontreinigingen uit het verkregen extract (het gezuiverde DNA blijft dan over) en de andere werkt juist andersom en vist het DNA tussen de rest uit. De eerste levert meer DNA, de tweede levert minder DNA, maar wel in hogere concentratie en zuiverheid. In deze bijdrage wordt maar één spoor geanalyseerd; deze is geëxtraheerd met de eerste methode, waarvan bekend is dat deze slecht scoort bij bloedsporen. Omdat van spoor #10 het NFI heeft aangenomen, dat het alleen maar bestaat uit bloed, dus een ongelukkige keuze.<sup>1</sup>

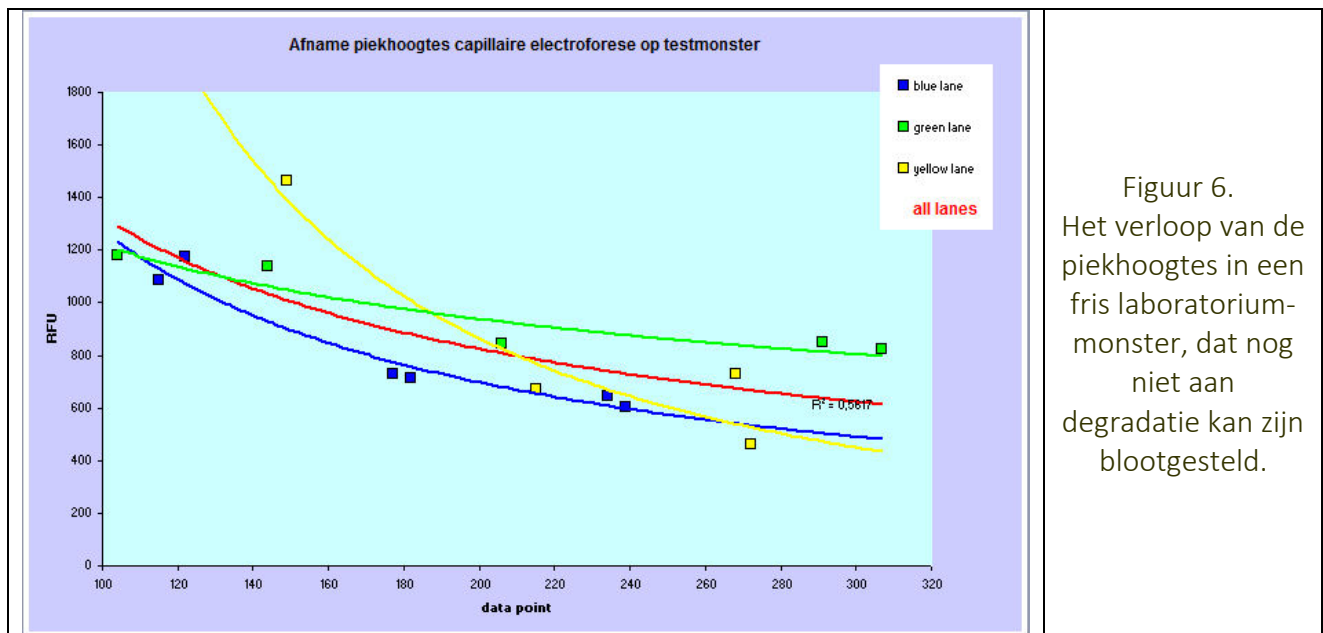
<sup>1</sup> Hier is iets vreemds aan de hand: de eerste negen sporen werden volgens de eerstgenoemde extractiemethode gezuiverd. In een tweede reeks metingen werd daarvan het eerste spoor (dus spoor #10) ook met deze methode gezuiverd, maar alle andere 10 sporen daaropvolgend met de tweede (meer geavanceerde) methode. De ratio daarvan ontgaat de auteur. Was er sprake van, dat spoor #10 in de verkeerde rapportage is terechtgekomen, dus in eerste instantie werd achtergehouden? Is spoor #10 meerdere malen geanalyseerd en zijn niet alle resultaten beschikbaar gesteld voor de bewijsvoering? Waarom werd spoor #10 met andere parameters onderzocht dan de overige sporen? Het NFI heeft hier iets uit te leggen.

- 2) Vervolgens wordt het STR-DNA via PCR uit het oorspronkelijke DNA geïsoleerd en vermenigvuldigd.
- a) Tijdens dit proces treden allerlei toevalligheden op, die niet helemaal waarde vrij zijn. Bij kleine hoeveelheden van een bepaalde DNA-bijdrage (in een mengsel) is de kans bovenmatig groot dat een bepaald spoor niet goed genoeg wordt geïsoleerd en daarmee vrijwel verdwijnt uit de latere waarnemingen (drop-out).
  - b) Ook treden er afwijkingen op wat betreft de lengtes van het geïsoleerde STR-DNA, zowel naar onder (veel vaker) als naar boven. Hierdoor verschijnt een deel van de meetresultaten op de verkeerde plaats (datapoint) in het uiteindelijke profiel. Men spreekt in dit verband van stutters.  
Van de mate van deze afwijkingen bestaat overigens wel een beeld en dat kan in de berekeningen worden geïntegreerd zo men wenst. In EuroForMix is gebruikgemaakt van een globale benadering. Elders heeft de auteur dezes een meer specifieke benadering gekozen, waardoor de keuze voor een gemengd profiel nog dwingender wordt (<https://deemzet.nl/6/2/5/links.htm>).
  - c) Verontreinigingen die meeliften vanaf de extractie (vooral in de als eerste beschreven methode) kunnen de processen, die in de PCR benut worden, hinderen. Zo is bekend dat resten van bloed de PCR negatief katalyseren (inhibitie). Sporen met verschillende herkomst kunnen zo niet goed worden vergeleken.
  - d) Wordt er teveel DNA toegelaten tot het PCR-proces, dan ontstaat er uitputting van de toegevoegde componenten (enzymen en DNA-monomeren). Het vervaardigen van kopieën van kleinere fragmenten zal daar minder onder leiden dan het kopiëren van de grotere. Er ontstaat dan een massaal effect van drop-outs in het rechter gedeelte van het gevormde elektroferogram. In de collectie sporen in de Deventer Moordzaak zijn de sporen #7 en #12 hiervan duidelijke voorbeelden. Het blijft een raadsel, waarom deze sporen niet alsnog opnieuw zijn geanalyseerd (te beginnen met het PCR-proces) om de gebrekkige uitkomst te corrigeren.
  - e) Tijdens de PCR worden 28 golfbewegingen in de temperatuur gecreëerd; tijdens de periodes met lage temperatuur vinden de kopieerslagen plaats. Als dat kopiëren in zo'n periode bij een bepaald fragment (te) laat een aanvang neemt (alweer gestuurd door toevalligheden) zal de kans op voltooiing van dit proces gaan afhangen van de lengte van het te kopiëren fragment. Wordt het kopieerproces niet voltooid, dan ontstaan er restproducten met een willekeurige omvang, waarbij tijdens de eigenlijke meting (3) achtergrondruis ontstaat; vooral rechts in de elektroferogrammen levert dat een gebrek aan resolutie op.
- 3) Tijdens de meting zelf van de samenstelling van het STR-DNA (capillaire elektroforese), dus bij het bepalen van het profiel, gaat ook van alles mis.
- a) Eerst moet het DNA-mengsel in de gel worden geloodst, om ervoor te zorgen dat er een scheiding ontstaat op basis van de beweeglijkheid van de verschillende onderdelen van het DNA-mengsel. Dat proces heet elektrokinetische injectie en maakt zelf ook gebruik van de beweeglijkheid van de DNA-fragmenten o.i.v. een elektrisch veld dat nota bene even sterk is als het veld, dat de eigenlijke meting verricht. De deeltjes met een hogere beweeglijkheid zijn dus bevoordeeld en dat zie je goed terug in ieder elektroferogram. De pieken erin lopen altijd af in de richting van kleine naar grote DNA-fragmenten (dus af naar rechts; de zogenaamde ski-slope).



- b) Tijdens de meting zelf spoeden de deeltjes zich van de ingang naar de uitgang van een capillair gevuld met gel, waar de detector huist. Hoe langer dat duurt (grotere fragmenten), des te langer de deeltjes onderworpen zijn aan de warmtebeweging, die de groep van gelijke deeltjes als het ware uit elkaar speelt. Het apparaat, waarin dit alles gebeurt is vrij warm (rond de 50 °C). Hierdoor verschijnt een dergelijke groep meer gespreid aan de uitgang en wordt deze moeilijker te onderscheiden van de altijd aanwezige achtergrond aan deeltjes die onbedoeld zijn ontstaan, bijvoorbeeld, doordat de PCR steken laat vallen (zie 2e).
- c) De lagere doorstroomsnelheid betekent automatisch ook, dat er zich minder deeltjes tegelijkertijd door de detectiezone bewegen, zodat de detectie-eenheden (opgewekte fotonen) zich minder goed onderscheiden van het achtergrondsignaal. Daardoor verliest een piek zowel hoogte als breedte.
- 4) Ook de kwaliteit van het aangeboden DNA-spoor speelt hier een rol. Indien DNA-sporen langere tijd aan destructieve omstandigheden zijn blootgesteld, zal een deel ervan worden aangetast. Zolang dat niet binnen het gedeelte gebeurt dat voor de forensische bepalingen wordt gebruikt is dat geen probleem. Maar de kans dat de destructieve werking wel binnen de grenzen optreedt is afhankelijk van de grootte van het DNA-gebied, dat tijdens het PCR proces wordt geïsoleerd. Dus weer treedt een negatief effect op bij grotere DNA-fragmenten.

Het is mogelijk de effecten onder 2 en 3 en 4 met elkaar te vergelijken. Gebruikt men fris laboratorium materiaal (zoals referentiesporen uit wangslim) dan blijkt het verloop van de piekhoogtes al aanzienlijk. Bij het analyseren van verouderd DNA wordt het effect gewoon verdubbeld. Het effect van het afnemen van de piekhoogtes is ondergebracht in een tweetal benamingen: de ski-slope en de degradation-slope. Om voor de hand liggende redenen wordt hier de voorkeur gegeven aan de eerste term.



Figuur 6.  
Het verloop van de piekhoogtes in een fris laboratoriummonster, dat nog niet aan degradatie kan zijn blootgesteld.

Hoe dan ook, er moet flink 'gegoocheld' worden met parameters, om het gezochte profiel te kunnen nabootsen. Hoe meer er moet worden 'gegoocheld' des te kleiner de waarschijnlijkheidsfactor van het nieuwe profiel om het te laten passen bij het gevonden profiel. De likelihood van de verklaring voor dat profiel is dan lager.

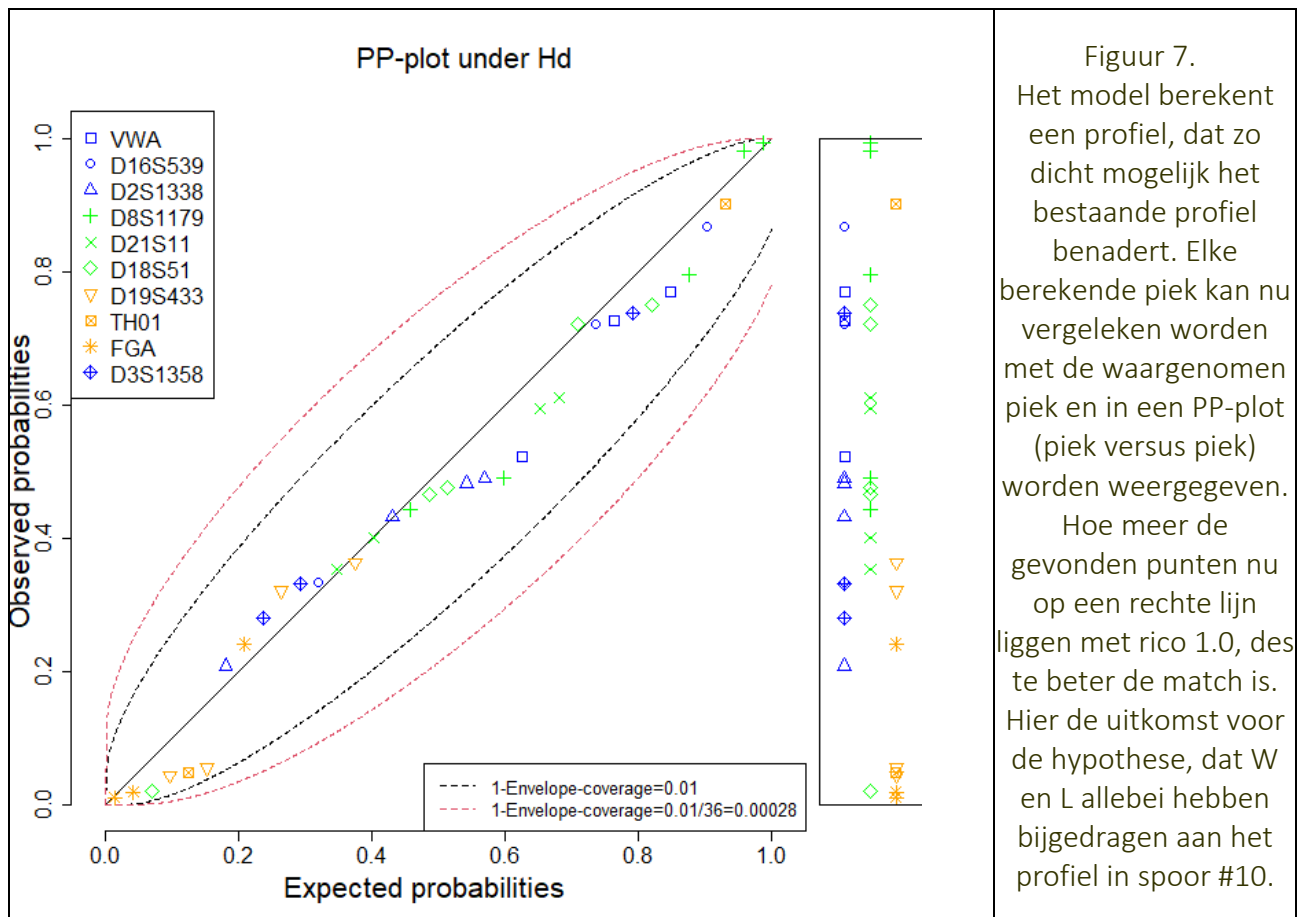
### Werkwijze

De waarschijnlijkheid van een correcte uitkomst in het hier onderzochte profiel is daadwerkelijk steeds zeer klein, zo in de orde van grootte van  $10^{-104}$  voor de Hd tot  $10^{-106}$  voor de Hp, zie de tabel verderop voor de actuele cijfers. Waar het bij deze kleine waarden echter steeds om gaat is de onderlinge vergelijking. Voor de Deventer Moordzaak geldt ten aanzien van spoor #10 dat de Hd steeds duidelijk hoger is dan de Hp, overigens in afhankelijkheid van de gekozen parameters. En daar gaat het uiteindelijk om: wat is de betekenis van het bewijsstuk in het licht van de vraag naar schuldig of onschuldig.

Het model laat enige variatie aan input toe. Bij het vergelijken van de uitkomsten, die steeds een duidelijke voorkeur voor de Hd laten zien, is het van wezenlijk belang, welke minimale piekhoogten als significant worden gezien. In de zogenaamde binaire benadering werd een piek dan weer wel en dan weer niet meegeteld op basis van overwegingen die niet per se rationeel behoeften te zijn. In de zogenaamde continue benadering wordt bij voorkeur geen keuze vooraf gemaakt. De software rules. Indien men de meetwaarden handmatig moet invoeren - zoals in de onderhavige studie - wordt dat weer lastig. Daarbij spelen de volgende afwegingen een rol:

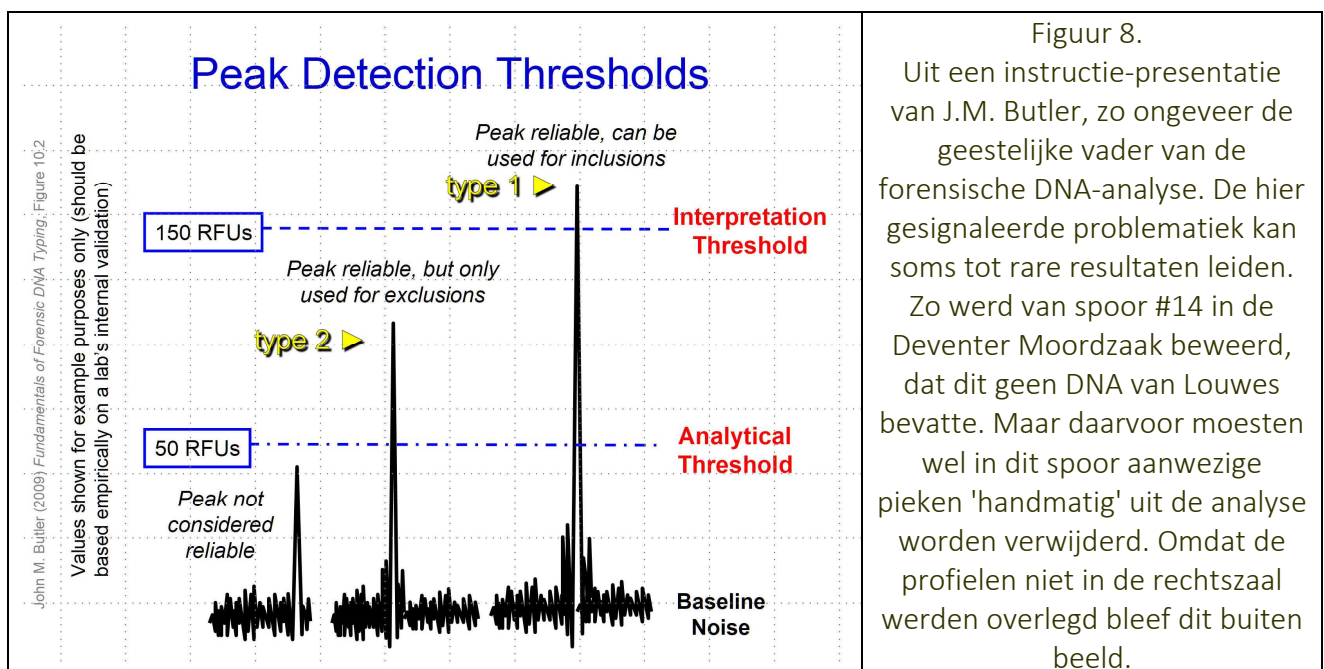
1. Is een piek stevig genoeg als bewijsmateriaal tegen de verdachte?
2. Kun je een kleine piek weglaten, vooral als deze ontlastend is voor de verdachte?



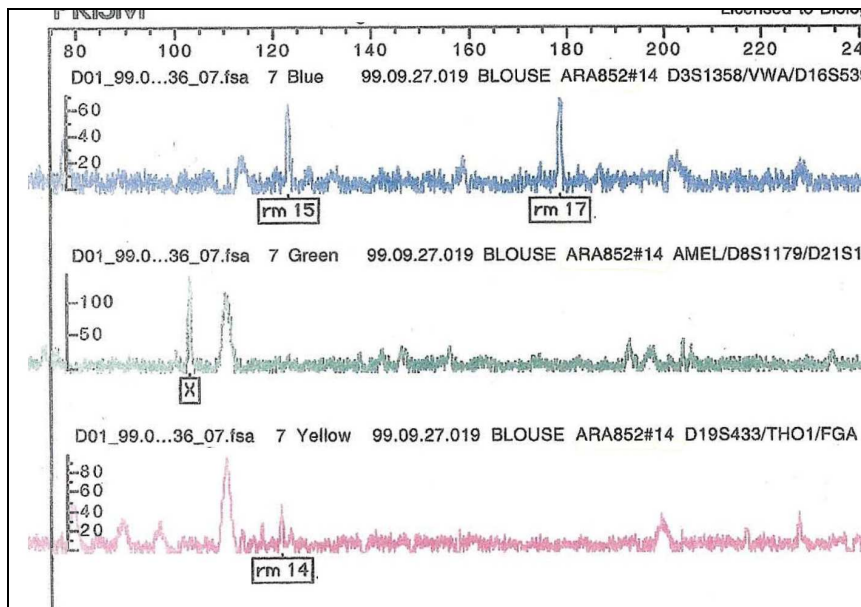


Figuur 7.  
Het model berekent een profiel, dat zo dicht mogelijk het bestaande profiel benadert. Elke berekende piek kan nu vergeleken worden met de waargenomen piek en in een PP-plot (piek versus piek) worden weergegeven. Hoe meer de gevonden punten nu op een rechte lijn liggen met rico 1.0, des te beter de match is. Hier de uitkomst voor de hypothese, dat W en L allebei hebben bijgedragen aan het profiel in spoor #10.

De laatste overweging is niet zo gebruikelijk, reden wellicht waarom dit aspect nergens in de procesvoering van de Deventer Moordzaak werd belicht. De track-record van het NFI op dit punt is beroerd, men leze het rapport Posthumus over de Schiedammer Parkmoord er maar eens op na (met name eind pagina 43 waar "geen profiel" als uitkomst wordt gegeven tegen beter weten in en ten nadele van de toenmalige, inmiddels vrijgesproken verdachte). De volgende illustraties verduidelijken dit dilemma:



Figuur 8.  
Uit een instructie-presentatie van J.M. Butler, zo ongeveer de geestelijke vader van de forensische DNA-analyse. De hier gesignaleerde problematiek kan soms tot rare resultaten leiden. Zo werd van spoor #14 in de Deventer Moordzaak beweerd, dat dit geen DNA van Louwes bevatte. Maar daarvoor moesten wel in dit spoor aanwezige pieken 'handmatig' uit de analyse worden verwijderd. Omdat de profielen niet in de rechtszaal werden overlegd bleef dit buiten beeld.

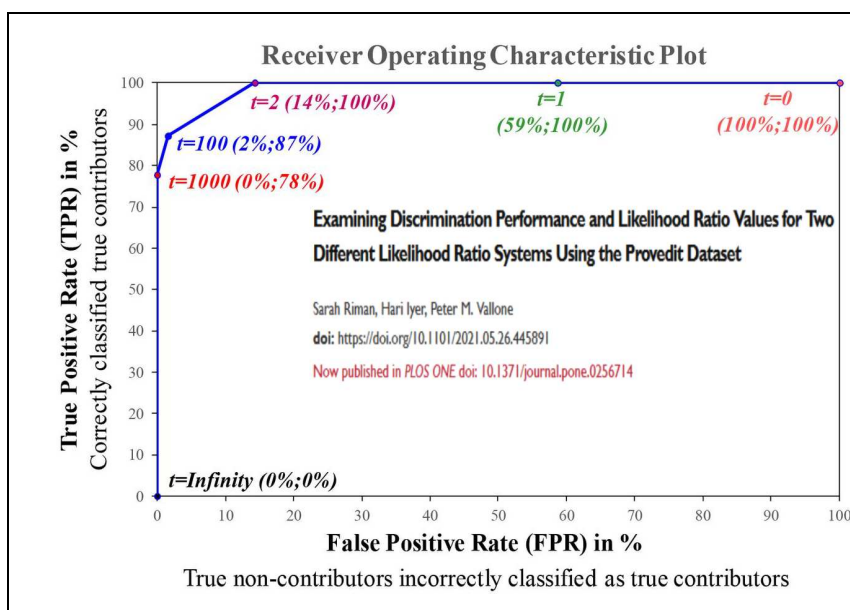


Figuur 9.

Het linker gedeelte van het profiel van spoor #14, dat geen enkel DNA-spoor bevatte volgens de rapportage van het NFI. Met deze vaststelling werd de gewelddadige overdracht van andere DNA-sporen verdedigd. Niet vermeld werd, dat daarvoor het door software getekende profiel eerst handmatig was ontdaan (rm = removed manually) van alle aanwijzingen van het tegendeel.

De analyse in EuroForMix vraagt dus om beslissingen vooraf. Je kunt met name instellen, welke pieken nog 'meetellen' door het instellen van een threshold. Een van de aanbevelingen is, om hier terughoudend in te zijn, immers moet de software het origineel zo nauwkeurig mogelijk kunnen nabootsen. De input is opgenomen in de appendix. Ook een ander principieel punt dringt zich hier op: DNA-sporen worden vrijwel steeds 'handmatig' verzameld (hier: uit de blouse geknipt). De grondigheid van dit handwerk beïnvloedt de uiteindelijke verhouding tussen piekgrootte en threshold. Zo werden uit de blouse dan weer grote stukken katoen geknipt en elders weer kleine, uiteindelijk lagen de extreme waarden uiteen in de verhouding 1 : 10. Dus zouden de thresholds dat ook moeten doen.

Voor dit onderzoek zijn drie waarden gekozen, 10, resp. 50 en 100 rfu. De eerste met het oog op het principe van de continuous analysis, waarbij de software het maar moet uitzoeken (0 geeft hier een foutmelding - dat lijkt logisch). De waarde van 50 is in overeenstemming met het principe, gedemonstreerd door Butler, overeenkomstig het beginsel van de onschuldpresumptie. En de waarde 100 omdat die vaak voor 'inclusie' wordt, of beter werd gebruikt in de praktijk van de handmatige binaire analyse.



Figuur 10.

Het eerder opgevoerde validatie-artikel gebruikte een threshold van 35 RFU om de prestaties te beoordelen, omdat er geen lagere piek in de gebruikte test-profielen voor kwam. Dit komt overeen met de hier gevolgde keuze van onder meer  $t = 50$  RFU; lagere pieken zijn niet opgenomen in het geteste profiel, zie de appendix. Beide waarden liggen in de hoek, waar de beste resultaten worden gehaald (linksboven).



## Resultaten

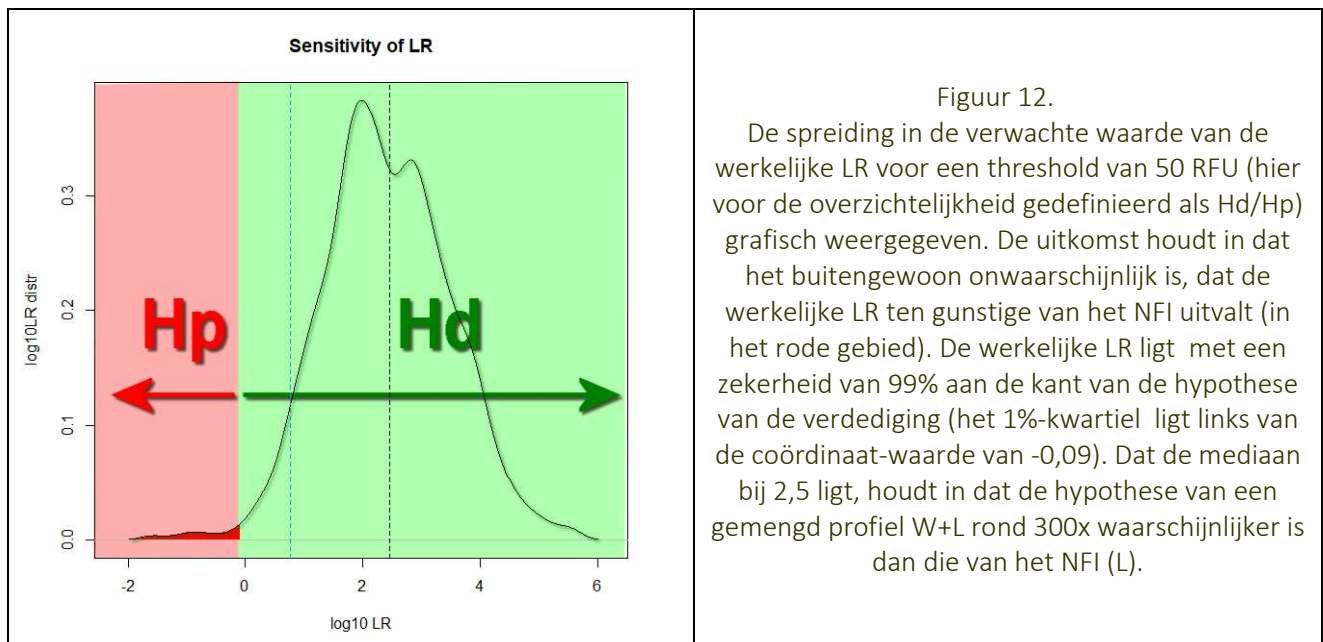
Zoals gezegd werden twee hypothesen vergeleken, de Hp voor een ongemengd profiel met alleen DNA van L en de Hd voor een profiel van L en W. Ook is de mogelijkheid meegenomen, dat het spoor gecontamineerd is met DNA van een tweede resp. derde, ook al is deze mogelijkheid later door het NFI bestreden.

Figuur 11. De resultaten (inclusief die van DNASTatistX, zie verderop).

| detection threshold | Hp    | Hd        | lik Hd      | lik Hp      | LR Hp/Hd   | LR Hd/Hp     | W : L |
|---------------------|-------|-----------|-------------|-------------|------------|--------------|-------|
| <b>EuroForMix</b>   |       |           |             |             |            |              |       |
| 10                  | L     | L + W     | 3.8 E -107  | 9.26 E -110 | 0.002435   | 400 : 1      | 1.8%  |
| 10                  | L + X | L + W + X | 3.8 E -107  | 4.66 E -109 | 0.01226    | 80 : 1       | 1.8%  |
| 50                  | L     | L + W     | 3.4 E -104  | 1.18 E -106 | 0.003482   | 300 : 1      | 2.6%  |
| 50                  | L + X | L + W + X | 3.4 E -104  | 7.3 E -106  | 0.02149    | 45 : 1       | 2.6%  |
| 100                 | L     | L + W     | 2.64 E -98  | 9.21 E -99  | 0.3485     | 3 : 1        | 1.8%  |
| 100                 | L + X | L + W + X | 2.64 E -98  | 1.02 E -98  | 0.3878     | 2.5 : 1      | 1.8%  |
| <b>DNASTatistX</b>  |       |           |             |             |            |              |       |
| 10                  | L     | L + W     | 7.19 E -117 | 2.52 E -124 | 0.00000028 | 3.600000 : 1 | 2.6%  |
| 10                  | L + X | L + W + X | 3.82 E -107 | 1.23 E -107 | 0.306      | 3.3 : 1      | 0.9%  |
| 50                  | L     | L + W     | 4.63 E -114 | 4.75 E -122 | 0.0000001  | 10000000 : 1 | 3.8%  |
| 50                  | L + X | L + W + X | 4.65 E -105 | 2.75 E -106 | 0.0588     | 17 : 1       | 2.2%  |
| 100                 | L     | L + W     | 2.87 E -107 | 1.91 E -110 | 0.000626   | 1600 : 1     | 3.4%  |
| 100                 | L + X | L + W + X | 4.91 E -99  | 2.37 E -99  | 0.500      | 2,0 : 1      | 1.6%  |

## Discussie

Hoe zeker is het dat de berekende LR ook de werkelijke LR is? We bekijken nader de hierboven gevonden uitkomst in EuroForMix voor de LR bij een threshold van 50 RFU. Groen betekent meer zekerheid dat de echte LR ten gunste van de verdediging uitvalt en in het rood zou het NFI gelijk krijgen.



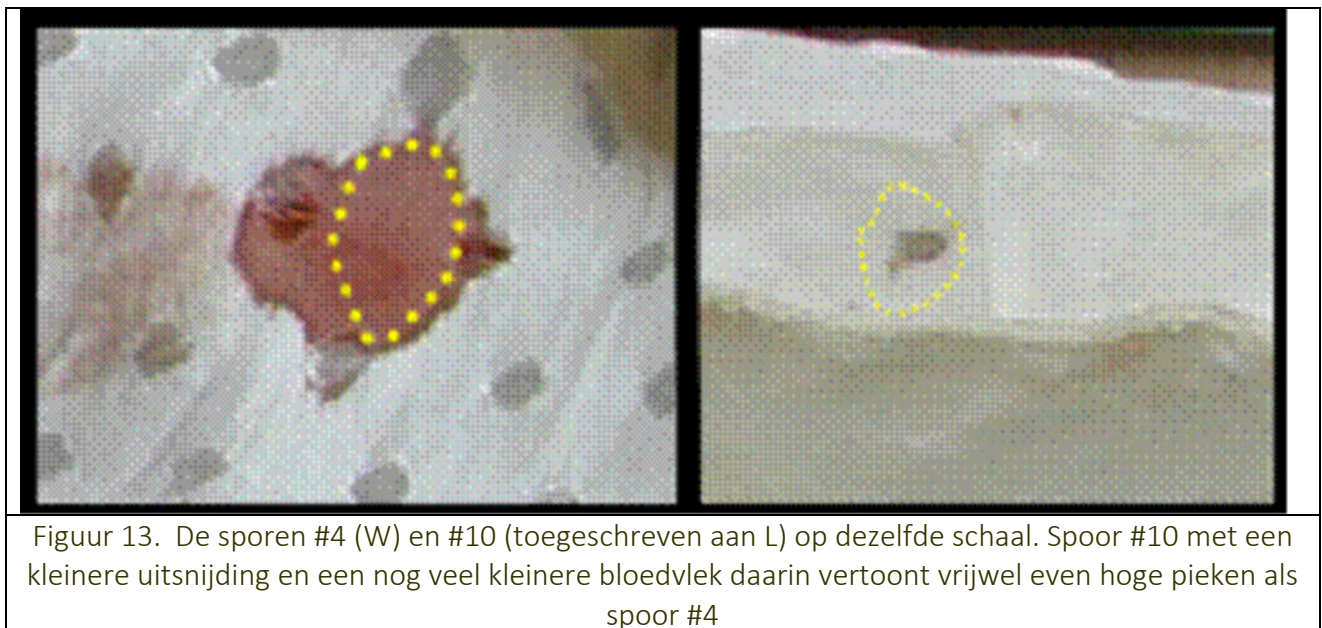
Bij het beoordelen van een dergelijk resultaat moet men nog eens bedenken, dat de nulhypothese dient te zijn, dat de verdachte onschuldig is en er sterke aanwijzingen nodig zijn om het tegendeel te veronderstellen. Die zijn er niet, in tegendeel, de hypothese van het NFI is steeds de minst waarschijnlijke.

Zoals eerder besproken levert het model onder Hd ook de verhouding op tussen de hoeveelheden DNA van W en L, zie de laatste kolom.

De hoeveelheid van W is steeds uitermate gering, matcht dat met het waarneembare bloedvlekje?

Om dit bevestigend te kunnen beantwoorden beschouwen we vier omstandigheden. Dit zijn ze:

- 1) Het spoor toont een zeer sterke aanwezigheid van L, terwijl het uitgeknipte monster juist kleiner is dan vergelijkbare monsters van W met een dergelijke hoog DNA-gehalte. Dit geldt met name voor de sporen #3, #4 en #5, die vrijwel geheel gevuld zijn met bloed van W. Het zichtbare bloedspoor in spoor #10 is in vergelijking daarmee gewoon te klein voor een dergelijk sterk signaal. Het moet uit een andere bron stammen, een met het blote oog onzichtbare bron, zoals speeksel van L. De afmeting van het zichtbare bloedvlekje ligt in de orde van grootte van slechts 10% van het gehele spoor.



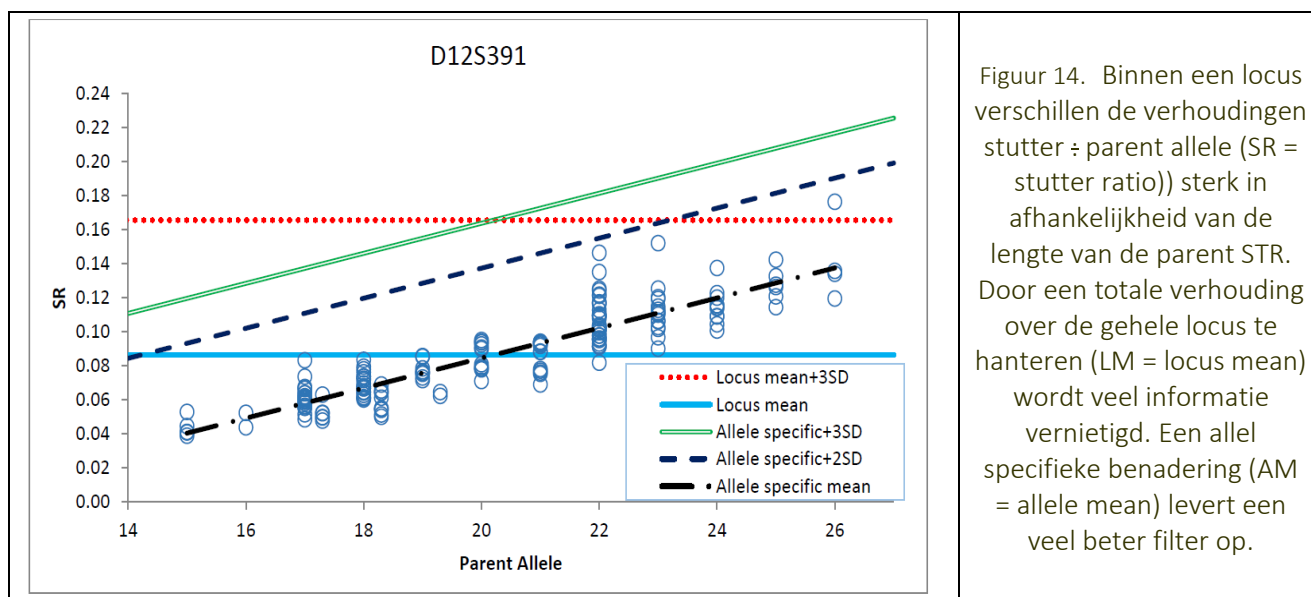
- 2) Het bloedspoor in #10 is duidelijk lichter van kleur dan de hierboven bedoelde bloedsporen, zodat dat een reden te meer is te veronderstellen, dat het aandeel 'bloed' in spoor #10 nog geringer is dan die 10%.
- 3) De aanwezigheid van vele nieuwe bloedsporen op de blouse op 26 september 1999, nadat ze op 25 september 1999 op de plaats delict niet aanwijsbaar waren, doet veronderstellen dat spoor #10 op soortgelijke wijze is ontstaan als overdruk vanuit eerder tijdens het delict op de blouse achtergelaten bloedsporen. Bij het overdrukken van bloedsporen van katoen op katoen zal er onevenredig veel DNA achterblijven in de oorspronkelijke vlekken aangezien leukocyten - de dragers van het DNA in het bloed - zeer selectief door cellulose en cellulose-derivaten worden gebonden. Dit blijkt onder meer uit de gerichte toepassing van dit soort producten om bloed van leukocyten te zuiveren voor medische toepassingen.
- 4) Hiermee overlappend: bij extractie met Chelex (waarmee spoor #10 werd geëxtraheerd) van bloedsporen vanaf cellulose blijft ongeveer de helft van het DNA achter in het monster. Andere extractiemethoden werken in deze situatie beter.

Gezien de geringe afmeting, de fletse kleur en het adsorptiegedrag van cellulose op leukocyten is het niet meer dan logisch te verwachten, dat het DNA-gehalte van monster #10 wat betreft het DNA van W in de orde van grootte van maar enkele procenten zal bedragen.

Het resultaat in EuroForMix is wel duidelijk. Het had nog duidelijker kunnen zijn, want EuroForMix houdt er geen rekening mee, dat het stuttergedrag als gevolg van de PCR niet bij elke piek in een profiel hetzelfde is. De manual van SGMPlus laat duidelijk zien dat het stuttergedrag per locus en binnen een locus per allel behoorlijk verschillend is (figuur 14). Korte allelen veroorzaken verhoudingsgewijs minder stutters, een situatie die zich in het profiel van spoor #10 herhaaldelijk voor doet, zie ook <https://deemzet.nl/6/2/5/links.htm>. Was dit gedrag in EuroForMix nader geïncorporeerd, dan waren de verschillen tussen de hypothesen wellicht nog groter geweest. Tevens missen we in het model hoe de wijze waarop de X en Y-amels aanwezig zijn wordt verdisconteerd. In spoor #10 is het X-amel behoorlijk dominant (136 %), terwijl het in het referentieprofiel van L juist enigszins recessief is (92%), weer een aanwijzing voor de aanwezigheid van extra W in spoor #10. Ook dit is weer afgebeeld in de genoemde link.

## DNASStatistX

Een soortgelijke opzet als EuroforMix zien we bij de software-tool DNASStatistX, die door het NFI is ontwikkeld, gebruikmakend van de rekenmethode in EuroForMix. Een eerste poging om de hierboven gepresenteerde resultaten te reproduceren faalde jammerlijk. De likelihoods die werden gescoord lagen een factor  $10^{-40}$  ongunstiger dan bij EuroForMix. Nadere raadpleging van de handleiding gaf een duidelijke oorzaak: DNASStatistX verwacht van de gebruiker, dat de profielen van stutters gezuiverd zijn. Inderdaad kun je in EuroForMix aangeven of er stutters in het profiel staan (en dat is ook zo uitgevoerd), maar bij DNASStatistX moet de gebruiker er zelf voor zorgen, dat de aangeboden profielen 'stuttervrij' zijn (zie ook figuur 1, waarin de vele stutters zichtbaar zijn). Hoe, daar is de documentatie van DNASStatistX niet erg concreet over.



Een nadere blik op dit verschil leverde nog een andere inkijk op: er bestaan twee soorten correcties voor het optreden van stutters, ze worden op LM (locus mean) en AM (allele mean) gebaseerd. Figuur 14 maakt duidelijk, wat voor een verschil dat maakt. In Kalafut et al (2018)<sup>2</sup> worden de data gegeven, die het mogelijk maken de stutters zo zuiver en compleet mogelijk weg te filteren. Daarbij doet zich de moeilijkheid voor, dat ook hier geen eenduidige oplossing beschreven staat voor het stuttervrij maken van een profiel.

De eerste stap is de aanwezige stutterpieken te vergelijken met een stuttergrens. In de genoemde referentie wordt een vaak toegepaste methode aangehaald: de stuttergrens wordt berekend uit de

<sup>2</sup> Tim Kalafut et al, 2018. Implementation and validation of an improved allele specific stutter filtering method for electropherogram interpretation. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.03.016>

parent peak height, vermenigvuldigd met de bijbehorende SR-waarde (zie figuur 14), waaraan men ook nog eens tweemaal de standaard deviatie van de gemeten SR's optelt. Dan blijven er nog maar heel weinig pieken staan, vergelijk de ongefilterde en gefilterde tabellen in figuur 16. Het ligt voor de hand de pieken, die niet aan deze grenswaarde voldoen naar 0 bij te stellen. Maar wat te doen met de overige pieken? Dat vermelden de bronnen niet. Ik heb twee methodes overwogen:

1. De mogelijk gecombineerde pieken met de stuttergrens verlagen. De consequentie is, dat bij een later toe te passen algehele threshold van 100 RFU niets overblijft en alle afwegingen hun relevantie verliezen. In feite pas je dan twee thresholds cumulatief toe.
2. De bedoelde pieken ongewijzigd gelaten. De algehele threshold wordt doorslaggevend. Sommige pieken zullen dan te hoog zijn, het effect is vermoedelijk gering wegens de algehele threshold.

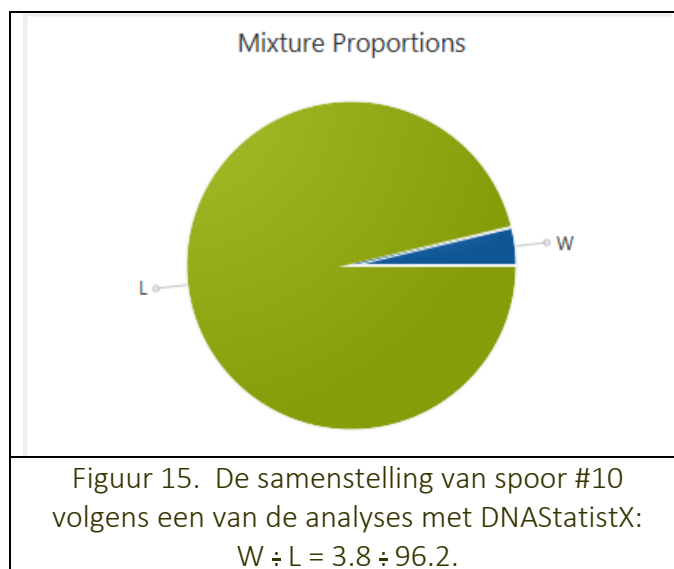
De laatste aanpak mij aangeraden van bevoegde zijde. Deze resultaten zijn verwerkt. De resultaten met DNASstatistX voor de centrale stelling '*spoor #10 is niet enkelvoudig*' komen hiermee op eenzelfde niveau te liggen als die van EuroForMix, zie figuur 11 met de samengevatte resultaten<sup>3</sup>.

## Conclusie

EuroForMix is enerzijds veel flexibeler dan DNASstatistX, zodat meerdere opties kunnen worden onderzocht en anderzijds hoeft er niet vooraf geknutseld te worden aan de input (het stutter filter werpt veel vragen op, omdat bijna alle stutters dan verdwijnen).

EuroForMix is ook veel toleranter betreffende de lay-out van de input. De output van EuroForMix bevat daarnaast vele grafische opties, die hier ook zijn getoond.

Via modelvorming d.m.v. het programma EuroForMix kan spoor #10 gereconstrueerd worden als een mengprofiel van twee betrokkenen: Wittenberg en Louwes in de verhouding van 1.8 : 98 tot 2.6 : 97. Hiermee ligt het het meest voor de hand het waargenomen bloedspoor in het uitgeknipte monster van spoor #10 te beschouwen als afkomstig van Wittenberg. De bijdrage van Louwes moet dan toegeschreven worden aan speeksel.



## Naschrift

Hangende nadere informatie zal dit rapport later nader worden aangepast.

28 juni 2022

---

<sup>3</sup> Dat is geen wonder, omdat beide toepassingen op dezelfde principes zijn gebaseerd. DNASstatistX heeft inmiddels een upgrade om ook profielen met stutters te verwerken. In principe werkt deze dan hetzelfde als EuroForMix. De update is nog niet vrijgegeven voor externe gebruikers. Inmiddels ondergaat ook EuroForMix een upgrade, waardoor stutters automatisch allele specifiek zullen worden gefilterd. Later in dit theater.

## Appendix

De input voor Euromix bestaat uit de piekhoogten in spoor #10 en de referentieprofielen van de twee betrokken DNA-donoren (POI's, persons of interest), te weten Louwes en het slachtoffer Wittenberg. Opdat de lezer e.e.a. zelf kan verifiëren zijn de gegevens hier gereproduceerd (ze verschenen eerder al voor het grootste gedeelte in Ton Derksen, Leugens over Louwes; ISVW-uitgevers, Leusden 2011). Alles hoger dan rfu 50 is opgenomen in het profiel (dat overigens niet wil zeggen, dat alles ook steeds werd meegerekend, zie de werkwijze).

| Sample Name | Marker  | Allele 1 | Allele 2 | Allele 3 | Allele 4 | Allele 5 | Height 1 | Height 2 | Height 3 | Height 4 | Height 5 |
|-------------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| spoor#10    | D16S539 | 11       | 12       | 13       |          |          | 100      | 1502     | 1167     |          |          |
| spoor#10    | D18S51  | 12       | 13       | 15       | 22       | 23       | 100      | 879      | 50       | 150      | 887      |
| spoor#10    | D19S433 | 12       | 13       | 14       | 15       |          | 125      | 1407     | 175      | 1309     |          |
| spoor#10    | D21S11  | 26       | 27       | 30       | 31       |          | 150      | 1247     | 150      | 1229     |          |
| spoor#10    | D2S1338 | 18       | 19       | 23       | 24       |          | 100      | 823      | 100      | 578      |          |
| spoor#10    | D3S1358 | 14       | 15       | 16       |          |          | 250      | 4223     | 94       |          |          |
| spoor#10    | D8S1179 | 7        | 8        | 12       | 13       | 14       | 150      | 2978     | 250      | 2596     | 115      |
| spoor#10    | FGA     | 22       | 23       |          |          |          | 150      | 1462     |          |          |          |
| spoor#10    | TH01    | 7        | 9.3      |          |          |          | 1095     | 1902     |          |          |          |
| spoor#10    | VWA     | 15       | 16       | 17       |          |          | 200      | 1675     | 1794     |          |          |

Figuur 16. Bijna de helft van de hierboven weergegeven pieken zijn of bevatten stutterpieken. In de volgende tabel zijn deze pieken omlaag gebracht met de methode, zoals weergegeven in Kalafut et al (2018)<sup>2</sup>. Hieronder is optie 1 voor DNASTatistX getoond. De pieken in stutterpositie, die ook in het profiel van W voorkomen zijn groen gemarkeerd. Ze liggen vrijwel allemaal onder de algemene thresholds van 50 en 100.

| Sample Name | Marker  | Allele 1 | Allele 2 | Allele 3 | Allele 4 | Allele 5 | Height 1 | Height 2 | Height 3 | Height 4 | Height 5 |
|-------------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| spoor#10    | D16S539 | 11       | 12       | 13       |          |          | 0        | 1502     | 1167     |          |          |
| spoor#10    | D18S51  | 12       | 13       | 15       | 22       | 23       | 20       | 879      | 50       | 10       | 887      |
| spoor#10    | D19S433 | 12       | 13       | 14       | 15       |          | 2        | 1407     | 6        | 1309     |          |
| spoor#10    | D21S11  | 26       | 27       | 30       | 31       |          | 46       | 1247     | 27       | 1229     |          |
| spoor#10    | D2S1338 | 18       | 19       | 23       | 24       |          | 15       | 823      | 28       | 578      |          |
| spoor#10    | D3S1358 | 14       | 15       | 16       |          |          | 0        | 4223     | 14       |          |          |
| spoor#10    | D8S1179 | 7        | 8        | 12       | 13       | 14       | 0        | 2978     | 25       | 2596     | 59       |
| spoor#10    | FGA     | 22       | 23       |          |          |          | 0        | 1462     |          |          |          |
| spoor#10    | TH01    | 7        | 9.3      |          |          |          | 1095     | 1902     |          |          |          |
| spoor#10    | VWA     | 15       | 16       | 17       |          |          | 38       | 1675     | 1794     |          |          |

Hieronder dezelfde resultaten maar nu onder optie 2, waardoor meerdere stutters nog relevante waarden hebben voordat de algehele threshold wordt toegepast.

| Sample Name | Marker  | Allele 1 | Allele 2 | Allele 3 | Allele 4 | Allele 5 | Height 1 | Height 2 | Height 3 | Height 4 | Height 5 |
|-------------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| spoor#10    | D16S539 | 11       | 12       | 13       |          |          | 0        | 1502     | 1167     |          |          |
| spoor#10    | D18S51  | 12       | 13       | 15       | 22       | 23       | 100      | 879      | 50       | 150      | 887      |
| spoor#10    | D19S433 | 12       | 13       | 14       | 15       |          | 125      | 1407     | 175      | 1309     |          |
| spoor#10    | D21S11  | 26       | 27       | 30       | 31       |          | 150      | 1247     | 150      | 1229     |          |
| spoor#10    | D2S1338 | 18       | 19       | 23       | 24       |          | 100      | 823      | 100      | 578      |          |
| spoor#10    | D3S1358 | 14       | 15       | 16       |          |          | 0        | 4223     | 94       |          |          |
| spoor#10    | D8S1179 | 7        | 8        | 12       | 13       | 14       | 0        | 2978     | 250      | 2596     | 115      |
| spoor#10    | FGA     | 22       | 23       |          |          |          | 0        | 1462     |          |          |          |
| spoor#10    | TH01    | 7        | 9.3      |          |          |          | 1095     | 1902     |          |          |          |
| spoor#10    | VWA     | 15       | 16       | 17       |          |          | 200      | 1675     | 1794     |          |          |

| Sample Name | Marker  | Allele1 | Allele2 |
|-------------|---------|---------|---------|
| W           | D16S539 | 11      | 12      |
| W           | D18S51  | 15      | 17      |
| W           | D19S433 | 14      | 14.2    |
| W           | D21S11  | 31      | 31.2    |
| W           | D2S1338 | 20      | 23      |
| W           | D3S1358 | 16      | 16      |
| W           | D8S1179 | 14      | 14      |
| W           | FGA     | 22      | 24      |
| W           | TH01    | 7       | 7       |
| W           | VWA     | 17      | 19      |

Figuur 17. De referentieprofielen.

In het profiel van W zijn de pieken, die matchen met spoor #10 in groen gemarkeerd.

| Sample Name | Marker  | Allele1 | Allele2 |
|-------------|---------|---------|---------|
| L           | D16S539 | 11 12   | 12 13   |
| L           | D18S51  | 13      | 23      |
| L           | D19S433 | 13      | 14 15   |
| L           | D21S11  | 27      | 31      |
| L           | D2S1338 | 19      | 23 24   |
| L           | D3S1358 | 15      | 15      |
| L           | D8S1179 | 8       | 13      |
| L           | FGA     | 22 23   | 22 23   |
| L           | TH01    | 7       | 9.3     |
| L           | VWA     | 16      | 17      |

De pieken in het referentieprofiel van L matchen allemaal, uiteraard, want dit spoor is dominant aanwezig. De pieken die samenvallen met het profiel van W zijn blauw gemarkeerd. De bijbehorende stutterpieken, die samenvallen met W zijn in geel aangeduid.

Zijn de gegevens van Kalafut et al. el waarmee de stutters werden gefilterd wel representatief? Om dat na te gaan, zijn ze vergeleken met de gegevens, zoals deze door een aantal forensische bureaus in de VS worden gehanteerd op basis van hun eigen validatiegegevens. Over het algemeen blijken alle gegevens dezelfde tendenzen te volgen. De hier te presenteren gegevens betreffen de gevonden parameters, die we ook in figuur 14 aantreffen (de regressielijn  $y = ax + b$  wordt gedefinieerd door de slope  $a$  en het intercept  $b$ ).



