

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismů

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Pavína Stejskalová

Forezní mikrobiologie

Microbial Forensics

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Daniel Vaněk, Ph.D.

Praha, 2024

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze,

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala RNDr. Danielu Vaňkovi, Ph.D., za cenné rady a čas věnovaný společným konzultacím.

Abstrakt

Forenzní mikrobiologie je mladý obor, jenž vznikl v reakci na antraxové útoky ze září a října 2001, později známé jako Amerithrax. Tehdy bylo cílem forenzní mikrobiologie analyzovat mikrobiální důkazní materiál asociovaný s bioterorismem a biozločinem. S nástupem metabarkódování a nástupem sekvenování nové generace bylo možné rozšířit pole působnosti forenzní mikrobiologie. V současnosti se tento obor uplatňuje v monitorování životního prostředí, využití personalizovaného mikrobiomu pro účely forenzní identifikace, ve studiu vlivu mikroorganismů na rozkladné procesy, ve vyšetřování sexuálně motivované trestné činnosti, při archeologických a antropologických výzkumech, interpretaci výsledků forenzní toxikologické analýzy nebo objasnění příčiny v případech náhlého úmrtí.

Klíčová slova: bioterorismus, bakteriologické zbraně, monitoring životního prostředí, mikrobiom, identifikace, PMI, stabilita forenzních vzorků, sexom, SIDS

Abstract

Microbial forensics is a young field that emerged in response to the Anthrax attacks in September and October 2001, later known as Amerithrax. At this time, forensic microbiology aimed to analyze microbial evidence associated with bioterrorism and biocrime. With the onset of metabarcoding and the advent of new generation sequencing, it has been possible to extend the scope of forensic microbiology. Nowadays microbial forensics can be applied in environmental monitoring, forensic identification based on personalized microbiomes, study of the influence of microorganisms on corpse decomposition, investigation of sexually motivated crime, archaeological and anthropological investigations, interpretation of forensic toxicology results and in the clarification in cases of sudden death.

Keywords: bioterrorism, B-agens, environmental monitoring, microbiome, identification, PMI, stability of forensic samples, sexome, SIDS

Obsah

Úvod.....	1
1. Bioterrorismus	2
2. Monitoring životního prostředí.....	3
2.1 Antrax jako enzootické onemocnění.....	3
2.2 Mikroorganismy v odpadních vodách.....	4
3. Mikrobiom.....	4
3.1 Kožní mikrobiom	5
3.2 Role kožních mikroorganismů ve forenzní identifikaci.....	6
3.3 Post-mortem kožní mikrobiom	8
4. Role mikroorganismů ve stanovení post-mortem intervalu	9
4.1 Mikrobiologie rozkladu.....	10
4.1.1 Fáze aktivního rozkladu.....	11
4.1.2 Fáze pokročilého rozkladu.....	12
4.2 Síť mikrobiálních rozkladačů.....	12
4.3 Stanovení PMI	14
5. Mikroorganismy a archeologické a antropologické výzkumy.....	15
5.1 Mikroorganismy v kryptách.....	15
5.2 Mikrobiální a lidská DNA uzavřená v zubním kameni	16
6. Mikroorganismy ve vyšetřování sexuálně motivovaných trestných činů.....	17
6.1 Vaginální mikrobiom	17
6.2 Penilní mikrobiom	18
6.3 Mikrobiální transfer během pohlavního styku	18
6.4 Sexuálně přenosné infekce.....	19
6.5 Trichologický materiál.....	20
6.6 Sliny	21
7. Mikroorganismy ve vyšetřování náhlých úmrtí.....	21
7.1 Syndrom náhlého úmrtí kojence	21
8. Mikroorganismy a forenzní toxikologie.....	22

8.1	Ethanol	23
8.2	γ -Hydroxymáseľná kyselina	24
	Závěr.....	26
	Seznam použité literatury	27

Seznam použitých zkratek

ABC	American Broadcasting Company
AMI	American Media, Inc.
CBC	Canadian Broadcasting Corporation
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EtG	Ethyl glukuronid
EtS	Ethyl sulfát
GABA	Kyselina gama-aminomáselná
GHB	Kyselina gama-hydroxymáselná
GIT	Gastrointestinální trakt
Glu	Kyselina glutamová
HCV	Hepatitis C Virus
HIV	Human Immunodeficiency Virus
Ile	Isoleucin
Leu	Leucin
Lys	Lysin
MLVA	Multiple Locus Variable-number Tandem Repeat Analysis
NBC	National Broadcasting Company
NGS	Next Generation Sequencing
NIH HMP	National Institutes of Health Human Microbiome Project
OTUs	Operational Taxonomic Unit
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMI	Post-mortem interval
Pro	Prolin
rRNA	Ribosomální ribonukleová kyselina

SARS-CoV-2	Severe Acute Respiratory Syndrome-related Coronavirus 2
SIDS	Sudden Infant Death Syndrome
SNPs	Single Nucleotide Polymorfismus
SPI	Sexuálně přenosné infekce
STR	Short Tandem Repeat
Trp	Tryptofan
USS	United States Ship
Val	Valin
WBE	Wastewater-based Epidemiology
WHO	World Health Organisation

Úvod

Po teroristickém útoku na Světové obchodní centrum 11. září 2001 byly 18. září a 9. října téhož roku Poštovní službou Spojených států amerických odeslány dopisy obsahující spory antraxu. Tento bioteroristický útok si vyžádal 5 lidských životů, přičemž dalších 22 lidí se potýkalo s infekcí. Do moderních dějin se tato událost později zapsala jako Amerithrax a předznamenala zrod forenzní mikrobiologie, která byla pro potřeby vyšetřování definována jako vědecká disciplína s cílem analyzovat a interpretovat důkazní materiál zajištěný při bioteroristickém incidentu, biozločinu a neúmyslném uvolnění mikroorganismu nebo toxinu z nedbalosti (Budowle et al., 2003). Z této definice vyplývá, že zbraně biologického původu slouží, podobně jako ty bodné nebo střelné, k poškozování vytipovaných jedinců. Zdaleka se ale nejedná o novou a dříve neznámou problematiku, protože v řadě historických konfliktů se lze setkat s prvky bioterorismu. Příkladem může být příchod evropských osadníků do Nového světa, kde dosud neznámá infekční onemocnění napomohla zdecimování imuno-naivní domorodé populace.

Od roku 2001 došlo vedle obrovského rozmachu forenzní mikrobiologie, jejímž cílem již není „pouze“ zajišťování důkazního materiálu souvisejícího s bioterorismem, i k renezanci mikrobiologie jako takové. Dnes je forenzní mikrobiologie obecně definována jako vědecká disciplína s mezioborovým přesahem, jejímž cílem je zajišťování a studium mikrobiologického důkazního materiálu při vyšetřování trestních a občanskoprávních případů (Schmedes et al., 2016). Díky rozsáhlému studiu lidského mikrobiomu vyšlo najevo, že je možné použít unikátní kožní mikrobiální komunity, podobně jako daktyloskopický otisk, v individuální identifikaci nebo v propojení osoba-místo/předmět. Analogicky se v propojení pachatel-oběť nabízí uplatnění genitálního mikrobiomu (včetně mikrobiomu pubického ochlupení), mikrobiálního transferu během pohlavního styku nebo sexuálně přenosných infekcí (SPI) ve vyšetřování sexuálně motivované trestné činnosti a identifikaci tělních tekutin. Současně byla prokázána role mikroorganismů ve stanovení post-mortem intervalu (PMI), vyšetřování náhlých úmrtí, interpretaci závěrů forenzní toxikologické analýzy, spolupráci s archeologickými a antropologickými výzkumy anebo při odhalování možných biologických hrozeb díky monitoringu životního prostředí. Ačkoli se tento výčet uplatnění může zdát poněkud nesourodý, rolí forenzní mikrobiologie je vedle správné interpretace důkazního materiálu také asistence dalším forezním vědám ve vyšetřování. Cílem této literární rešerše je představit vývoj forenzní mikrobiologie a jednotlivých aplikací tohoto oboru.

1. Bioterrorismus

Ačkoli bývá antrax nejčastěji spojován s incidentem ze září a října 2001, byl jako potenciální biologická zbraň intenzivně studován již během druhé světové války (Manchee et al., 1981), druhé japonsko-čínské války (Kimura, 2023) a studené války (Meselson et al., 1994). Známým incidentem, jenž předcházel Amerithraxu, je událost z června 1993, kdy náboženská sekta Aum Shinrikyo pomocí disperzního zařízení ve svém sídle v Kameidu (Tokyo, Japonsko) vypustila do ovzduší suspenzi obsahující spory *Bacillus anthracis*. Tento incident upadl v zapomnění až do roku 1996, kdy byl vůdce sekty obviněn z řady dalších skutků (nejznámějším zůstává útok sarinem v tokijském metru z 20. března 1995). Tehdy se členové sekty přiznali, že jejich cílem bylo rozpoutat epidemii inhalačního antraxu, po které by následovala světová válka (Smithson, 2000; Takahashi et al., 2004). Nicméně až v únoru 2000 byla suspenze zajištěná v červenci 1993 analyzována pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR), která potvrdila přítomnost *B. anthracis*. Zjištěný genotyp získaný pomocí multiple-locus variable tandem repeat analysis (MLVA) byl konzistentní s genotypem ve Sterneově 34F2 antraxové vakcíně, která byla v Japonsku komerčně dostupná pro veterinární medicínu. Použitý kmen *B. anthracis* se nicméně vyznačuje sníženou virulencí v důsledku absence plazmidu pX02, na němž jsou lokalizované geny pro tvorbu bakteriální kapsule, jež je majoritním faktorem virulence *B. anthracis* (Keim et al., 2000; Keim et al., 2001). Tento případ však každopádně dokazuje, že k vytvoření potenciálně nebezpečné biologické zbraně není zapotřebí vědecká laboratoř, natož vzdělání nebo praxe.

Antraxové útoky z roku 2001 byly oproti pokusu Aum Shinrikyo provedeny mnohem sofistikovaněji, a pokud by nedošlo k přijetí řady bezpečnostních opatření a zahájení intenzivního vyšetřování, pravděpodobně by tato událost nabrala katastrofálních rozměrů, i přes to si ovšem vyžádala pět lidských životů. Dopisy z 18. září byly doručeny do newyorských sídel několika sdělovacích prostředků (televizní stanice NBC, ABC, CBC a deník New York Post) a do kanceláře bulvárního vydavatelství AMI (West Palm, Florida), kde byl zachycen tzv. index case (nultý pacient) (Bush et al., 2001; Traeger et al., 2002). Klíčovým důkazem byla identifikace kmene zajištěného *B. anthracis*, k čemuž došlo relativně brzy, a to již 5. října 2001 (Hoffmaster et al., 2002; Read et al. 2002). Jednalo se o tzv. Amesův kmen využívaný v řadě výzkumných zařízení, kde byl pro svou vysokou virulenci zkoumán v souvislosti s vývojem vakcín. Fakt, že se jednalo o laboratorní kmen, automaticky vyloučil možnost nákazy v případě nultého pacienta zaznamenaného 2. října 2001 na Floridě přirozeně se vyskytujícím kmenem *B. anthracis*, což potvrdilo prvotní spekulace o možném bioteroristickém útoku. Dopisy z 9. října 2001 byly adresovány senátorům Thomasi Daschleovi (The Hart Senate Office Building, Washington, DC) a Patricku Leahyovi (Capitol Hill, Washington, DC), v jehož případě byl kontaminovaný dopis zadržen ještě před doručením. Pro vyšetřovatele byla navíc problematická interpretace sekundárních nálezů, k nimž pravděpodobně došlo při manipulaci s dopisy v průběhu jejich doručení do finálních destinací (Amerithrax Investigative Summary, 2010).

Pro potřeby vyšetřování bylo nutné jednoznačně identifikovat zdroj kmene, jehož spory byly zajištěny v dopisech. Zmíněná MLVA neposkytovala v tomto případě rozlišení na požadované úrovni, jelikož *B. anthracis* vykazuje signifikantní genetickou homogenitu, a proto bylo použito celogenomové sekvenování (WGS), což v té době byla jediná metoda poskytující rozlišení na požadované úrovni (Keim et al., 1997). Navíc byly při kultivaci spor z dopisů pozorovány morfologické variace kolonií a všechny v porovnání s ancestrálním Amesovým kmenem měly sníženou schopnost tvořit spory, resp. vykazovaly tzv. oligosporogenní fenotyp, jenž mj. ovlivňuje právě morfologii kolonií (Worsham a Sowers, 1999). Čtyři z těchto morfologických variací byly podrobeny intenzivnímu výzkumu. Sekvenací bylo zjištěno, že floridský izolát Amesova kmene je identický s ancestrálním Amesovým kmenem, který je považován za zdroj všech kmenů používaných v laboratořích pro výzkumné účely (Ravel et al., 2009). Zajímavá situace nastala v případě genomových sekvencí zmíněných morfologických variant, kdy se každá z nich lehce odlišovala na úrovni jednonukleotidových polymorfismů (SNPs), indelů nebo duplikací, což vedlo k vývoji analytických postupů založených na PCR. Následovalo testování 1077 vzorků z repozitáře FBI, z nichž právě osm vykazovalo variace totožné s těmi, jež byly odhaleny ve všech čtyřech morfologických variantách. Těchto osm vzorků pocházelo z laboratoří U.S. Army Medical Research Institute for Infectious Diseases (USAMRIID, Fort Detrick, Maryland), a to konkrétně z kultury označené jako RMR1029, případně ze subpopulací z ní derivovaných. Tento mikrobiální důkaz napomohl zúžit okruh suspektních vzorků, každopádně nepotvrdil, ale ani nevyvrátil, zda se jedná o čin jednotlivce nebo organizované skupiny (Amerithrax Investigative Summary, 2010; Keim et al., 2011).

2. Monitoring životního prostředí

2.1 Antrax jako enzootické onemocnění

Terminologický slovník Ministerstva vnitra ČR definuje pojem enzootie jako hromadné onemocnění zvířat probíhající v určitém (omezeném) místě, které se dále nešíří. Pro enzootické oblasti je typická sezonalita v podobě střídání období sucha a dešťů. V takových lokalitách může k epidemiím enzootických onemocnění docházet dokonce i v pravidelných intervalech, nicméně se lze setkat i se sporadickým výskytem, a to i v zemích, kde antrax není považován za přímou hrozbu. Rekurentní epidemie antraxu byly hlášeny z oblastí jižní a centrální Afriky a Asie, ale také v arktických oblastech během letního období, kdy je sluneční svit k dispozici celých 24 hodin (Anthrax in Humans and Animals, 2008).

Pokud je nákaza zachycena i v lidské populaci, většinou se jedná o následek kontaktu s nakaženým zvířetem, konzumace kontaminovaného masa, ale i situace, kdy nedošlo k řádné dekontaminaci prostředí a odstranění zvířecích mršin, resp. tyto případy slouží jako indikátory přítomnosti onemocnění u zvířat. Příkladem může být epidemie antraxu v rámci sobí populace v červenci 2016 v Jamalsko-

něneckém autonomním okruhu, která vedla i ke ztrátám na lidských životech. Z celkového počtu 111 000 suspektních zvířat byla nákaza potvrzena u 2 657 z nich, přičemž během 20. století byly zaznamenány případy, kdy v konkrétní oblasti během jednoho roku došlo ke ztrátám tisíců až milionů zvířat. Paradoxně i přesto byla události z července 2016 věnována mnohem větší pozornost (Shadomy et al., 2016). Důvodem je, že za posledních 75 let nebyl v této konkrétní oblasti hlášen žádný případ nákazy antraxem u zvířat nebo člověka. Podle recentních studií se jedná o přímý důsledek abnormálních teplot, jež vedou k odtávání permafrostu a expozici mršin kontaminovaných sporami *B. anthracis*, které tak mohou zvířata pozřít společně s pastvou (Revich a Podolnaya, 2011; Walsh et al. 2018; Iglovsky a Kriauciunas, 2021; Liskova et al. 2021).

2.2 Mikroorganismy v odpadních vodách

Mikroorganismy obývající odpadní vody vytváří komplexní ekosystém, jenž se podílí na degradaci organické hmoty. S vysokou abundancí se v odpadních vodách vyskytuje rod *Bacillus* a *Clostridium*, jejichž zástupci vynikají svou odolností vůči změnám podmínek prostředí díky schopnosti vytvářet spory. Důležitou součástí tohoto ekosystému představují také denitrifikační a enterické bakterie. I přes výhodné funkce tohoto ekosystému jsou odpadní vody obecně považovány za zdroj patogenních mikroorganismů a parazitických prvoků nebo helmintů. V drtivé většině se jedná o původce onemocnění předávaných fekálně-orální cestou, jako je například gastroenteritida, která může mít virový, bakteriální i parazitický původ (Mudge a Ball, 1964).

Nedávná koronavirová pandemie ukázala, jak zásadní význam má monitoring a epidemiologický přístup k analýze povrchových a odpadních vod. I když jsou koronaviry z těla odstraňovány primárně respiračními sekrety (nový typ koronaviru SARS-CoV-2 byl identifikován právě v bronchoalveolární tekutině (Zhu et al., 2020), byly viriony detekovány i ve stolici, kam se dostávají z infikovaných buněk GIT, což naznačuje možný fekálně-orální způsob přenosu (Xiao et al., 2020) a také kontaminaci odpadních vod. Možnost monitorovat přítomnost virových částic ve vzorcích umožňuje PCR v reálném čase (qPCR), konkrétně u koronavirů se přistupuje k RT-qPCR (PCR v reálném čase s reverzní transkripcí), přičemž cílem je včas zachytit možnou další vlnu epidemie (Mlejnková et al., 2020).

Monitorování odpadních vod v kombinaci s epidemiologickým přístupem (Wastewater Based Epidemiology, WBE) nicméně není výdobytkem poslední doby. Už na počátku 21. století bylo navrženo využití analýzy odpadních vod jako neinvazivního postupu při dokazování užívání omamných látek (Daughton, 2001). Teprve později se ukázalo, že se jedná o vhodný postup pro vyhodnocování zdravotního rizika obyvatelstva.

3. Mikrobiom

Zájem o studium mikroorganismů obývajících lidské tělo projevili již koncem 17. století Antoni van Leeuwenhoek, který porovnával mikroorganismy nalezené v dutině ústní a mikroorganismy nacházející

se ve fekáliích (Leeuwenhoek, 1683). Zároveň si všímal rozdílů mezi mikrobiotou zdravého a nemocného jedince. Nicméně za období vzniku mikrobiologie jako nového vědního oboru se pokládá až druhá polovina 19. století, kdy se jejímu rozvoji prakticky věnovali Robert Koch a Louis Pasteur. Tehdy byla prokázána souvislost mezi patogenním mikroorganismem a nemocí. Dnes je ale díky novým poznatkům zřejmé, že pouze malá část mikroorganismů vykazuje patogenicitu. Drtivá většina mikroorganismů zastává esenciální role pro funkci ekosystému nebo poskytuje výhodné interakce s dalšími mikroby a makroorganismy (Berg et al., 2020).

Lederbergem vytvořený termín mikrobiom představuje komunitu komenzálních, symbiotických a patogenních mikroorganismů, se kterými sdílíme naše tělo. Mikrobiota pak popisuje uskupení mikroorganismů obývajících konkrétní mikrohabitat (Lederberg a McCray, 2001; Marchesi a Ravel, 2015). Dříve všeobecně uznávaný fakt, že buňky mikrobiomu početně převyšují buňky lidské až desetkrát, se na základě revize dat provedené v roce 2016 zdá být chybný. Jako pravděpodobnější se jeví skutečnost, že mikrobiální buňky jsou stejně abundanční jako buňky lidské. Toto zjištění ale nikterak neubírá na zásadní roli mikrobiomu. Dnes předpokládáme, že tělo dospělého člověka, tj. referenční osoby ve věku 20 až 30 let, o váze 70 kg a výšce 170 cm (International Commission on Radiological Protection, 1975) tvoří 30 trilionů buněk a mikrobiom 38 trilionů buněk (Sender et al., 2016).

3.1 Kožní mikrobiom

Kůže, největší orgán lidského těla, vytváří bariéru chránící před vlivy nehostinného vnějšího prostředí. Zároveň poskytuje útočiště pro různorodou mikroflóru sestávající z bakterií, hub, virů a mikroeukaryot. Kožní mikroflóra vykazuje adaptace na odlišné mikrohabitaty lidského těla. Mezi její důležité funkce patří interakce s hostitelskými buňkami prostřednictvím mutualistických a komenzálních interakcí, čímž podněcuje nejen imunitní odpověď, inhibici kolonizace a infekce oportunními a patogenními mikroorganismy, ale dokonce i reparaci tkání (Flowers a Grice, 2020). Tento složitý ekosystém mikroorganismů obývá fyziologicky a topograficky odlišné niky, jako jsou například hladké a suché pouště předloktí nebo vlhké tropické lesy podpaží (Marples, 1969).

Kožní mikrobiom je primárně strukturován na základě selekčních tlaků hostitele, resp. lokálních fyziologických podmínek. Jakmile jednou dojde k ustálení vnitřních faktorů během období vedoucí k adolescenci, stabilizuje se i mikrobiom (Oh et al., 2016). Proto je kožní mikrobiom dospělých jedinců relativně stabilní, nicméně jej značně ovlivňuje topografie kůže (Findley et al., 2013; Oh et al., 2014). Na základě stability kožního mikrobiomu je proto možné odhadnout chronologický věk dospělého jedince (Huang et al., 2020). Nicméně zásadní roli v jeho formování zastává variabilita dvou vnitřních faktorů lidských populací, demografie a antropometrie. Demografie a životní styl podobně jako fyziologické faktory jsou se strukturou mikrobiomu pevně spjaté. Zkoumání těchto faktorů má zásadní význam pro pochopení, zda přispívají ke zdravé mikrobiální komunitě kůže, nebo ji ovlivňují nepřímo prostřednictvím změn kožního mikrobiomu. Exponovaná místa jsou mnohem náchylnější k narušení

mikrobiálních komunit díky vnějším vlivům (Dimitriu et al., 2019). Je tedy zřejmé, že biogeografická a temporální stabilita kožního mikrobiomu nejsou výsledkem pouze hostitelských selekčních tlaků, ale jsou tvarovány i pomocí vnějších faktorů (Oh et al., 2016; Dimitriu et al., 2019) a změny ve fyziologii kůže mohou dále podmiňovat i kosmetické přípravky (Bousslimani et al., 2015).

Pro zachování interakcí s hostitelem musí mikrobiální signální mechanismy, metabolické dráhy nebo imunogenní vlastnosti vykazovat místně specifický výskyt. Není proto náhodou, že i kožní onemocnění svým výskytem kopírují rezidentní mikroflóru (Oh et al., 2014). Několik faktorů, jako je lokální anatomie kůže, obsah lipidů, pH nebo sekrece potu a kožního mazu, bylo identifikováno jako faktory podporující rozvoj kožních onemocnění. Zároveň ale korelují s výskytem predominantní mikrobioty. Příkladem mohou být mazové žlázy na obličeji, hlavě, hrudníku nebo zádech produkující množství kožního mazu, což podporuje výskyt lipofilní anaerobní bakterie *Propionibacterium acnes*, která v těchto lokalitách dominuje. Dalším příkladem může být převaha zástupců z rodu *Staphylococcus* a *Corynebacterium* na pokožce trupu a dolních končetin, dále výskyt mikrobiálních komenzálů horních cest dýchacích v oblasti nosních dírek a v případě vnějšího zvukovodu i mikroorganismy asociované s ušním mazem (Costello et al. 2009; Grice et al., 2009).

Kůže se na rozdíl od ostatních částí těla (např. trávicí soustava) vyznačuje vyšším zastoupením virů a hub. U většiny jedinců běžné kožní druhy mikroorganismů existují jako heterogenní mix kmenů, což vyvolává otázku, zda tranzice ze stavu normálního do patogenního je mono- nebo multifyletická a zda nízká heterogenita těchto kmenů má vliv na incidenci nebo průběh onemocnění. Je tedy jasné, že značný pokles v diverzitě mikrobiálních komunit je charakteristickým znakem rozvoje kožního onemocnění, jako je například atopická dermatitida (Kong et al., 2012).

3.2 Role kožních mikroorganismů ve forenzní identifikaci

Kožní mikroorganismy mohou být snadno přeneseny na různé povrchy, na kterých jsou díky rezistenci vůči enviromentálním stresům schopné dlouhodobě přežít, což kupříkladu zdůrazňuje význam řádné hygieny rukou zdravotnického personálu (WHO guidelines, 2009). Člověk během každodenních aktivit zanechá na řadě povrchů perzistentní „stopu“ ve formě mikroorganismů asociovaných s kůží, a jelikož kůži každého jedince obývají personalizované, v čase stabilní a přenosné komunity mikroorganismů, nabízí se jejich využití ve forenzní identifikaci. Podobně jako DNA fingerprint je i tento mikrobiální analogií ke klasickému daktyloskopickému otisku a unikátní pro každého z nás (Fierer et al., 2010), nicméně najdou se i studie, které tuto analogii označují jako zavádějící. Na rozdíl od běžně používaných daktyloskopických stop založených na neměnných a pro každého člověka unikátních papilárních liniích, se ty mikrobiální v čase rapidně mění, a to i na površích, kterých se konkrétní osoba dotýkala. Pokud by měly být mikrobiální vzorky použity pro potřeby dokazování, je třeba brát v potaz i to, že k odběrům bude často docházet i mimo uzavřená prostředí domácností, ve kterých se tato problematika nejčastěji studuje, a že na venkovní, resp. veřejná prostranství mají značný vliv i podmínky prostředí (Wilkins et

al., 2017). I přes to bylo dokázáno, že mikrobiální komunity asociované s člověkem disponují odchylkami na úrovni kmenů (strain-level variation), které jsou dostatečné pro rozlišení osob pro účely forenzní identifikace (Franzosa et al., 2015).

Na povrchu dlaní se s vysokou abundancí vyskytují rody *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* a *Corynebacterium*, které bylo možné detekovat ve všech analyzovaných vzorcích. Jedná se o běžné rezidentní bakterie kožního mikrobiomu (Grice et al., 2009). Naopak tzv. vzácně se vyskytující bakteriální taxony s nízkou abundancí vytváří oproti těmto kožním rezidentům tranzientní nebo dlouhodobě perzistující uskupení, jejichž struktura je pravděpodobně determinována vlivem specifické hygieny.

Z hlediska laterality horních končetin se interpersonálně bakteriální diverzita významně neliší, situace je ale mnohem zajímavější v případě intraindividuální diverzity, ačkoli jsou si bakteriální komunity zajištěné na obou dlaních překvapivě podobné mnohem více, než jak bylo zpočátku předpokládáno, nicméně bakteriální komunity obou horních končetin spolu sdílí v průměru pouze 17 % fylogypů, což naznačuje enormní intraindividuální heterogenitu. Vliv laterality na složení bakteriálních komunit povrchu dlaní mají odlišné kožně-enviromentální podmínky dominantní a nedominantní horní končetiny, mezi které se řadí produkce kožního mazu, salinita, hydratace a také to, že dominantní končetina více přichází do kontaktu s nejrůznějšími povrchy a předměty. Dále bylo zjištěno, že bakteriální diverzita mikroorganismů asociovaných s pokožkou horních končetin je vyšší u žen než u mužů (Fierer et al. 2008).

Pomocí kožních mikroorganismů lze člověka spojit s určitým prostředím nebo předmětem. Příkladem mohou být mobilní telefony, na kterých se vyskytují mikroby odpovídající mikrobiomu majitele. Kůže člověka spolu s jeho mobilním telefonem sdílí v průměru o 5 % více operačních taxonomických jednotek (OTUs) než s mobilním telefonem jakékoli další osoby (Meadow et al., 2014). I přesto, že je možné na základě mikrobů zanechaných na povrchu různých předmětů provést individuální identifikaci, není tato metoda vhodná pro sledování, kde se konkrétní osoba v nedávné době pohybovala. Důvodem je rapidní obrat (turnover) mikrobiálních komunit asociovaných s povrchy (Lax et al., 2015a; Wilkins et al. 2017). Nicméně znalost těchto komunit vyskytujících se v prostředí města a interiéru v kombinaci s personalizovaným mikrobiomem představuje budoucnost forenzního vyšetřování. Pochopení dynamiky mikrobiálních komunit je mimo forenzní využití zásadní i pro determinaci progresu mikrobiální kolonizace kojenců vystavených mikroorganismům domácnosti. Hlavním zdrojem jsou mikroorganismy vlastní obyvatelům domácnosti, což na dítě může mít negativní dopad v případě, že je jeho vznikající mikrobiom v dysbióze. Nicméně imunitní systém dítěte se na tento zjednodušený ekosystém domácnosti postupně adaptuje a je pravděpodobné, že tento proces povede k environmentálně podmíněným patologickým stavům vyskytujících se v rodině, mezi které patří astma, alergie, a dokonce i deprese (Lax et al., 2014; Lax et al., 2015b).

Mikrobiální otisk prstu se do interiéru dostává díky olupování kůže (až 50 % prachu tvoří právě odloupenuté epidermální buňky), respirační aktivitě a kontaktu s povrchy. V důsledku této interakce může každý člověk prostřednictvím svého kožního mikrobiomu v určité míře měnit mikrobiální ekologii interiéru. Při pobytu ve vnitřním prostředí dochází k jeho rapidní kolonizaci mikrobiotou konkrétního člověka, a dokonce lze tento mikrobiální otisk domácnosti přiřadit jejím obyvatelům. Na základě nalezených mikroorganismů na různých površích v domácnosti lze predikovat mikrobiální otisk jejích obyvatel a současně je možné od sebe jednotlivé členy domácnosti odlišit (Bronswijk, 1981; Lax, 2014). Pokud v domácnosti společně s rodinou žije i pes, sdílí spolu tato rodina více kožních mikrobiálních komunit. Majitel psa se svým vlastním psem bude sdílet více mikrobů asociovaných s povrchem těla než s jakýmkoli jiným zvířetem (Song et al., 2013).

Využití mikroorganismů pro účely forenzní identifikace může sloužit jako nezávislé potvrzení výsledků získaných pomocí klasických metod, jako je např. analýza lidské DNA nebo daktyloskopie. Navíc lze tento postup využít i za podmínek, kdy není možné izolovat lidskou DNA jednoduše proto, že nebyla odebrána kvalitní biologická stopa (např. krev, tkáň, sperma nebo sliny). Analogicky lze postupovat i v případě, kdy nelze kvůli nevhodnému povrchu nebo rozmazání získat použitelný daktyloskopický otisk (Fierer et al., 2010). Pro orgány činné v trestním řízení znamená existence personalizovaných kožních mikrobiálních komunit rozšíření znalostí o důkazním materiálu a dále poskytuje základní informace o podmínkách, za kterých lze během vyšetřování propojit mikrobiální otisk osoby s mikroorganismy nalezenými na předmětech a površích na místě činu nebo pro potřeby individuální identifikace. Vhodnými povrchy pro izolaci kožních mikroorganismů pro účely propojení předmětu s konkrétní osobou jsou keramika a plast. Jedná se o tzv. kandidátní povrchové materiály, na kterých může mikrobiální otisk přetrvat až jeden den, a právě na tyto materiály by se budoucí studie měly detailněji zaměřit. Pravděpodobnost propojení konkrétní osoby a zanechaného materiálu se zvyšuje při opakovaném doteku, resp. čím častěji se osoba předmětu dotkne, tím vyšší šance, že se ji na základě detekovaných kožních mikroorganismů podaří s předmětem spojit. V případě, že se předmětu dotkne více osob, lze i přesto získat relativně silný signál pro identifikaci, jelikož někteří lidé zanechávají lépe detekovatelný mikrobiální otisk než ostatní (Knight et al., 2018).

3.3 Post-mortem kožní mikrobiom

Mikroorganismy odebrané z kůže zemřelého, ať k jejich odběru došlo časně nebo později, sdílejí s jím používanými předměty unikátní mikrobiální komunity, a je tedy možné tuto osobu spojit s konkrétními předměty a místem. Studie z roku 2018 a 2019 potvrzují, že lze propojit post-mortem (PM) kožní mikrobiom s předměty osobní potřeby, jako jsou např. potřeby zdravotnické a kuřácké, případně nádobí, brýle knihy, volant atd., a dokonce i plastové vaky určené pro přenášení lidských ostatků. Složení PM kožního mikrobiomu bylo během transportu a skladování těla v márnici i přes mírné fluktuace poměrně stabilní a tato stabilita byla dále detekována i mezi složením PM kožního mikrobiomu a mikrobiomu zajištěným na již zmíněných předmětech osobní potřeby a plastových vacích.

PM kožní mikrobiom je obecně velmi podobný a v některých případech identický jako ante-mortem kožní mikrobiom. Složení PM kožního mikrobiomu se během ohledání místa činu, transportu těla a jeho skladování v márnici téměř nemění, a proto teoreticky není nutné odebírat mikrobiální vzorky ihned na místě činu, ačkoli se obecně doporučuje pravý opak. Personalizované kožní mikrobiální komunity perzistují během časně post-mortem periody, a proto je díky nim možné před zahájením pitvy propojit konkrétní osobu s předměty a povrchy na místě činu, které rovněž charakterizuje určité uskupení mikroorganismů (Knight et al., 2018; Pechal et al. 2018; Kodama et al. 2019).

4. Role mikroorganismů ve stanovení post-mortem intervalu

Post-mortem interval (PMI) popisuje dobu, která uplynula od úmrtí do okamžiku nálezu těla. Jedná se o základní aspekt oboru soudního lékařství a klíčovou komponentu lékařskoprávního vyšetřování. Představuje zásadní údaj, na jehož základě lze potvrdit svědecké výpovědi, vyloučit podezřelé, vytvořit časový snímek událostí, vyslovit vyšetřovací verze nebo podpořit důvěryhodnost důkazního materiálu (Nelson, 2000; Henßge a Madea, 2004; Knight et al., 2004; Maile et al., 2017; Byrd a Castner, 2001).

Předběžné stanovení PMI je založeno na svědeckých výpovědích rodinných příslušníků, sousedů nebo spolupracovníků. Lze vycházet i z tzv. antemortem důkazního materiálu, jako jsou noviny, kalendáře, lékařské záznamy, případně aktivita mobilního telefonu nebo na sociálních sítích. Pokud nejsou tyto informace dostupné, může být stanovení PMI obtížné, jelikož pak se lze spoléhat výhradně na posmrtné změny, fázi rozkladu nebo na organismy přítomné na mrtvém těle nebo v jeho okolí. Jedná-li se o úmrtí náhlé a bez přítomnosti lékaře, který by na místě konstatoval smrt (unattended death), anebo bylo tělo nalezeno ve fázi pokročilého rozkladu, je znalost PMI zásadní pro včasné zahájení náležitých úkonů (Maile et al., 2017).

Pro odhad doby smrti a stanovení PMI se využívá posmrtných změn. Mezi časně posmrtné změny s forenzním významem patří bledost (*pallor mortis*), posmrtné skvrny (*livor mortis*), hypostáza, posmrtná ztuhlost (*rigor mortis*) a chladnutí (*algor mortis*). Pozdní posmrtné změny, zejm. změny hnilobné, mají pro odhad doby smrti a stanovení PMI většinou nulový význam. Vliv na proces a trvání rozkladu mají pochopitelně i podmínky prostředí, zejm. pak teplota a vlhkost.

Pokud tělo není dostatečně chráněno, může být osídleno nekrofágními organismy. V postupných vlnách dochází ke kolonizaci různými druhy členovců se složitými životními cykly, jejichž znalost v kombinaci se studiem vývoje přítomných jedinců a exprese larválního genu umožňuje určit alespoň minimální dobu, která uplynula od smrti. Výstup forenzní entomologické analýzy nicméně nelze vždy považovat za spolehlivý vzhledem k vlivu podmínek prostředí. Kontroverzními metodami stanovení PMI je posouzení stupně natrávení žaludečního obsahu nebo chemický rozbor sklivcové tekutiny, nicméně ani jedna z nich není dostatečně validní, aby na základě takto získaných dat bylo možné provádět další úkony (Knight et al., 2004; Tarone a Foran, 2011). Studie z posledních let naznačují mnohem širší

uplatnění mikrobiologie jako forenzní vědy, než jak tomu bylo na počátku tohoto tisíciletí, kdy forenzní mikrobiologie vznikla v odpovědi na antraxové útoky (Budowle et al., 2003; Fierer et al., 2010; Pechal et al., 2014).

S rozvojem forenzní mikrobiologie vyvstala otázka, zda je možné využít poznatky týkající se skladby, temporální a topografické stability mikrobiomu mimo jiné i pro stanovení PMI. Studium této problematiky s sebou přineslo i odpovídající terminologii. Nekrobiom je definován jako komunita archeálních, bakteriálních a eukaryotických druhů asociovaná s rozkládajícími se ostatky heterotrofní biomasy. (Benbow et al., 2013). Thanatomikrobiom na rozdíl od nekrobiomu zahrnuje výhradně mikroorganismy, které se po smrti vyskytují ve vnitřních orgánech (mozek, srdce, játra a slinivka) a v krvi. Jedná se o výsledek úpadku funkce imunitního systému. Uvnitř mrtvoly proto dochází k proliferaci, odumírání a relokizaci mikroorganismů, což má za následek změny v temporální stabilitě a složení mikrobiálních komunit (Can et al., 2014; Javan a Finley, 2018). Naproti tomu epinekrotické mikroorganismy obývají povrchy ostatků, jako je kůže nebo sliznice ústní dutiny (Pechal et al., 2014). Další mikroorganismy se pak vyskytují v půdě samotného hrobu v těsné blízkosti mrtvoly.

Mikroorganismy kolonizující lidské tělo podstupují po smrti hostitele změny na základě probíhajících posmrtných procesů (Hyde et al., 2013). Díky epinekrotickým mikroorganismům je možné stanovit minimální PMI (minPMI, analogicky fyziologický čas). Jedná se o údaj typický pro forenzní entomologii a popisuje období, kdy dospělá samice poprvé získala přístup k mrtvole, resp. jedná se o dobu, která uplynula od naklazení vajíčka až po zajištění a zhodnocení nejstaršího přítomného vývojového stadia nekrofágního hmyzu. Pomocí minPMI lze konstatovat, že zesnulý musel být alespoň po tuto dobu mrtev. Na základě přítomných druhů epinekrotických mikroorganismů lze analogicky popsat časně posmrtné období. (Byrd a Castner, 2001; Amendt et al., 2007; Pechal et al., 2014).

Pro popis minPMI, resp. doby od uložení mrtvol do experimentálního prostředí, což bylo ve studii prováděné na prasečím modelu v intervalu 2 až 3 hodin od okamžiku smrti (Pechal et al., 2014), lze využít epinekrotické komunity mikroorganismů, mezi které patří zástupci kmenů *Bacteroidetes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* a *Firmicutes*. Jedná se o vůbec první studii, která pro stanovení minPMI používá mikroorganismy. S postupujícím rozkladem lze pozorovat negativní lineární závislost bakteriální diverzity na čase a dále pokles alfa-proteobakterií a dominanci gamma-proteobakterií v pokročilé fázi rozkladu, což je konzistentní s nálezy dalších studií (Metcalf et al., 2013; Guo et al., 2016; Ashe et al., 2021).

4.1 Mikrobiologie rozkladu

Obecně lze změny asociované s rozkladem živočišné tkáně rozdělit do dvou časových úseků. První z nich je charakterizován narušením integrity těla, prvním kontaktem tekutin s hrobovou půdou a přítomností nekrofágního hmyzu. Jedná se o období nadýmání těla způsobené hnilobnými procesy a aktivitou bakterií. První úsek popisuje fázi aktivního rozkladu. Během druhého úseku dochází

ke zpomalení rozkladu vlivem nedostatku měkkých tkání, které jsou již téměř rozloženy (Cobaugh et al., 2015).

4.1.1 Fáze aktivního rozkladu

Jak dokládá studie prováděná na myším modelu (Metcalf et al., 2013), první ze zmiňovaných úseků z hlediska mikroorganismů charakterizuje posun v jejich zastoupení. Po smrti podstupují buňky autolýzu, čímž vytváří nový substrát pro mutualistické mikroorganismy. Denzní mikrobiální komunity gastrointestinálního traktu (GIT) tyto produkty efektivně metabolizují, což vede k nahromadění plynů, jehož následkem dochází k ruptuře dutiny břišní (Hauther et al., 2015). Nyní klesá abundance anaerobních a fakultativně anaerobních zástupců kmenů *Firmicutes* a *Bacteroidetes*, typických členů mikrobiomu GIT, a začíná dominovat kmen *Proteobacteria*. Jako příklad lze uvést řád *Rhizobiales* nebo *Enterobacteriales* reprezentovaný čeledí *Enterobacteriaceae* s rody *Serratia*, *Escherichia*, *Klebsiella* a *Proteus*. Mezi mikroorganismy se silnou vazbou na rozkládající se živočišnou tkáň se řadí rody *Acinetobacter* a *Peptoniphilus*. Například u rodu *Acinetobacter* je přítomnost až do stadia aktivního rozkladu prakticky nedetekovatelná (Howard et al., 2012; Burcham et al., 2024).

V důsledku ruptury dutiny břišní dochází k průniku sloučenin bohatých na dusík do okolního prostředí, což má vliv na pH a obsah živin v půdě. Na základě výsledků předešlých studií lze zpočátku pozorovat vzestup půdního pH z hodnoty 6 až na 8,5, což lze vysvětlit akumulací amoniakálního dusíku $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (Hopkins et al., 2000; Meyer et al., 2013). Změna v hodnotách pH s sebou pochopitelně nese určité konsekvence, které lze názorně popsat na bakteriích z kmene *Acidobacteria*, jejichž abundance nepřímo závisí na pH, ale zároveň může být ovlivněna i vysokou koncentrací živin v hrobové půdě (Cobaugh et al., 2015). Acidobakterie jsou typičtí oligotrofové a přirozeně se vyskytují v půdách s nízkou dostupností zdrojů, a proto dojde-li k influxu živin, bude jejich abundance klesat. Vzestup alfaproteobakterií z řádu *Rhizobiales* po ruptuře dutiny břišní lze mimo změnu pH a přístupu ke kyslíku vysvětlit i prostředím, které je nyní bohatší na živiny. Z těchto poznatků lze usuzovat, že přítomnost mrtvoly ovlivňuje půdní bakterie a vice versa (Fierer et al., 2007; Lauber et al., 2009; Ward et al., 2009; Metcalf et al., 2013; Burcham et al., 2024).

U zástupců kmene *Bacteroidetes* (konkrétně u rodu *Bacteroides*) se předpokládalo, že jejich výskyt v hrobové půdě je podmíněn výhradně přítomností mrtvoly, jelikož se jedná o součást mikrobiomu GIT, nicméně byl prokázán i jejich přirozený výskyt v půdě. Je zajímavé, že při sledování v posunu zastoupení jednotlivých kmenů během probíhajícího rozkladu, neposkytoval tento kmen, oproti již popsaným kmenům *Firmicutes*, *Proteobacteria* nebo *Acidobacteria*, významné změny. Toto pozorování lze vysvětlit tím, že se snižující se abundancí půdních zástupců *Bacteroidetes* se současně zvyšovala abundance mutualistických zástupců, které bylo možné detekovat pouze na bázi hrobu, což lze vysvětlit anoxickými podmínkami (jedná se o obligátní anaeroby) a pravděpodobně i zbývající měkkou tkáň. Pokud hrobová půda poskytuje mikroorganismům asociovaných s člověkem (kožní mikrobiom,

mikrobiom GIT) vhodné podmínky, mohou v takové lokalitě perzistovat až čtyři roky od uložení mrtvoly do hrobové jámy. Proto je možné tyto mikroorganismy považovat za potencionální markery rozkladu mrtvého těla, a to alespoň tam, kde lze na základě vnějších podmínek očekávat pomalejší průběh tohoto procesu (Metcalf et al., 2013; Cobaugh et al., 2015; Keenan et al., 2018).

4.1.2 Fáze pokročilého rozkladu

Fáze pokročilého rozkladu, popisovaná pomocí tzv. extended PMI, je oproti fázi aktivního rozkladu charakteristická poklesem půdního pH vlivem akumulace dusičnanového dusíku $\text{NO}_3\text{-N}$. Do doby ukončení migrace larválních stadií nekrofágního hmyzu v mrtvole je dominantním procesem cyklu dusíku amonifikace, nicméně později začíná převládat nitrifikace. V této fázi jsou hnilobné procesy téměř u konce (Payne, 1965; Carter a Tibbett, 2008; Meyer et al., 2013).

4.2 Síť mikrobiálních rozkladačů

Síť půdních mikrobiálních rozkladačů je fylogeneticky unikátní s nízkou abundancí do doby introdukce mrtvoly do prostředí. V průběhu rozkladu se do půdy dostává množství živin, kterého se chopí vzájemně interagující členové této sítě, jejichž cílem je nově se objevující látky metabolizovat. Vznik unikátní komunity mikrobiálních rozkladačů je proto reakcí na disturbanci v podobě influxu látek bohatých na proteiny a lipidy. Akumulace živin většinou vede k restrukturalizaci až destrukci nejbližšího rostlinného společenstva. Důvodem jsou vysoké koncentrace dusíku, který se zde vyskytuje primárně ve formě $\text{NH}_4^+\text{-N}$. Mimo dusíku se pak jedná o uhlík a fosfor. S postupujícím rozkladem je hrobová půda dále obohacena o kyselinu linolovou, aleuritovou, palmitovou, mastné kyseliny s dlouhým řetězcem, amidy mastných kyselin a v neposlední řadě o běžné aminokyseliny. V rané fázi rozkladu stoupá kompetice mezi mikroorganismy, které využívají stejný nebo podobný substrát, a proto lze s postupujícím rozkladem pozorovat posun v preferencích při využívání živin z mrtvoly. Obecně platí, že preferenčně dochází k utilizaci labilnějších látek, jako jsou aminokyseliny uvolněné degradací proteinů, což má za následek zvýšenou koncentraci stabilnějších látek, lipidů v prostředí. Proto se v hrobové půdě v rané fázi rozkladu akumulují látky lipidické povahy (Vass et al., 1992; Towne, 2000; Metcalf et al., 2016; Parmenter a MacMahon 2009; Burcham et al., 2024).

Během rozkladu lze zaznamenat tzv. cross-feeding fenomén, který lze popsat na příkladu zástupců kmenů *Proteobacteria* a *Firmicutes*. Cross-feeding molekuly jsou vedlejšími produkty rozkladu a nejčastěji se jedná o aminokyseliny. Gamaproteobakterie *Thiopseudomonas alkaliphila* (*Oblitimonas alkaliphila*) má schopnost cross-feedingu s dalšími gamaproteobakteriemi rodu *Ignatzschineria* a *Acinetobacter* a rody *Savagea* a *Vagococcus* z kmene *Firmicutes*. *T. alkaliphila* zmíněným rodům pravděpodobně dodává aminokyseliny asociované s rozkladem savčích těl (Ile, Leu, Trp, Val) společně s intermediátem metabolismu lipidů (sn-glycerol-3-fosfoethanolamin) a na oplátku získává železnaté ionty od rodů *Acinetobacter*, *Savagea* a *Vagococcus* nebo Glu, Pro a Lys od rodu *Ignatzschineria*. Analýza cross-feedingu odhalila několik potencionálních ornitinových a/nebo argininových

transportních systémů u rodů *Ignatzschineria*, *Savagea*, *Wohlfahrtiimonas* a pochopitelně i u *T. alkaliphila*, která je považována za centrum dekompoziční sítě přispívající ke zvýšené aktivitě metabolismu aminokyselin a v terestriální dekompozici má kontrolní funkci v utilizaci labilních zdrojů (Ashe et al., 2021; DeBruyn et al., 2021; Burcham et al., 2024).

Rozkladu živočišné tkáně se dále účastní i mikroskopická eukaryota, zejm. hlístice z čeledi *Rhabditidae*, nicméně zásadní roli v tomto procesu mají i houby z oddělení *Ascomycota*. Mikroskopičtí rozkladači z řad hub jsou na místo rozkladu, podobně jako nekrofágní hmyz umožňující disperzi mikroorganismů, rekrutováni pomocí specifických signálních molekul. Mezi takové molekuly patří putrescin s charakteristickým mrtvolným zápachem vznikající činností mikroorganismů. Houby angažované v procesu rozkladu reprezentují rody *Yarrowia* a *Candida*, známé rozbouráváním lipidů, proteinů a sacharidů (Fu et al., 2019), čímž umožňují vznik unikátní trofické interakce s *T. alkaliphila*, která tak dokáže tyto zdroje využít. Genomy těchto hub kódují potřebné biosyntetické vybavení pro exkreci ornitinu, který pak může využít *T. alkaliphila* vybavená ornitin dekarboxylázou konvertující ornitin na putrescin. *Yarrowia* a *T. alkaliphila* dominují ve fázi pokročilého rozkladu (Ashe et al., 2021). U zástupců rodu *Yarrowia* byl dále doložen vertikální přenos u nekrofágního hmyzu, kterému pravděpodobně usnadňuje konzumaci rozkládající se živočišné tkáně (Kaltenpoth a Steiger, 2014; Vogel et al., 2017). Mikroskopické houby společně s bakteriemi vytváří funkční společenství, ve kterém díky rozdělení zdrojů a cross-feedingu společně rozbourávají živiny bohaté na lipidy, proteiny a sacharidy. Houby asistují v rozkladu komplexní organické hmoty na jednodušší komponenty, jakými jsou aminokyseliny nebo mastné kyseliny utilizované bakteriemi (jako příklad lze uvést již zmíněnou *T. alkaliphila*), které tyto vedlejší produkty dekompozice efektivně metabolizují (Purahong et al., 2016).

S probíhajícím rozkladem se síť mikrobiálních rozkladačů stále více odlišuje od původně oddělených společenstev dutiny břišní, kůže a hrobové půdy. Na složení této sítě má na počátku vliv heterogenní selekce, která se zvyšuje vlivem stochastických sil. Naopak v průběhu rozkladu dominuje selekce homogenní, která vede ke snížení diverzity. V průběhu rozkladu budou kmény s obdobnými ekologickými nároky na konkrétních odběrových místech abundantnější než jiné, což potvrzuje zvýšený výskyt následujících čeledí v hrobové půdě a na kůži mrtvol: *Sphingobacteriaceae*, *Brucellaceae*, *Phyllobacteriaceae* a *Hyphomicrobiaceae* a *Alcaligenaceae* (Burcham et al., 2024). Tento nález je konzistentní s předchozími poznatky, že epinekrotické komunity mikroorganismů reflektují prostředí, se kterým jsou v kontaktu, což potvrzuje studie prováděná na krysím modelu se zaměřením na dutinu ústní a rektum (Guo et al., 2016). Podobně jako lidský ante-mortem mikrobiom ústní dutiny (Costello et al., 2009), vykazuje i ante-mortem mikrobiom ústní dutiny krysího modelu nízkou intrapersonální i interpersonální variabilitu. Překvapivě ale byla u krysího modelu zaznamenána vyšší post-mortem diverzita mikroorganismů v ústní dutině. Předpokladem ale bylo, že by si mikrobiom měl, alespoň v rané fázi rozkladu, ponechat obdobné složení, jaké bylo zaznamenáno ante-mortem. Neobvyklou post-mortem diverzitu lze vysvětlit kontaktem úst s hrobovou půdou nebo s exponovanou pokožkou modelu,

případně i tím, že po smrti přestává fungovat tvorba slin s antimikrobiálními účinky. Dalším možným vysvětlením je, že jsou kožní mikroorganismy díky silící kompetici postupně nahrazeny půdními komunitami. Naopak v post-mortem rektálních odběrech v rané fázi rozkladu, konzistentně s odběry prováděnými na živém modelu, dominují kmeny *Bacteroidetes* a *Firmicutes* postupně nahrazené proteobakteriemi, které v pokročilém stadiu plně dominují.

Proměny sítě mikrobiálních rozkladačů lze pozorovat napříč různými druhy savců a typy půd. Mikroorganismy účastníci se rozkladu lidského těla s největší pravděpodobností nejsou, jak uvádí studie prováděná na lidském modelu (Burcham et al., 2024), pro člověka unikátní a obecně se účastní rozkladu těl různých druhů savců. V ekologii rozkladu se v určitém rozsahu páruje taxonomické zařazení a metabolické schopnosti, a proto lze konkrétní změny ve složení sítě vysvětlit určitou funkční redundancí. Nedávné poznatky naznačují, že na přítomnost mrtvol v prostředí reagují mikroorganismy sestavením univerzální sítě rozkladačů (Metcalf et al., 2013; Pechal et al., 2014; Guo et al., 2016; Johnson et al., 2016; Dangerfield et al., 2020; Burcham et al., 2024).

4.3 Stanovení PMI

Těla ponechaná ve stejné lokalitě v konkrétním ročním období se budou rozkládat podobně. Příkladem může být mikrobiální síť rozkladačů sestavená v lokalitě lesa mírného podnebného pásu, která je charakteristická sdílením produktů metabolismu během přechodu z aktivního do pokročilého stadia rozkladu, kdy byl zaznamenán i vyšší cross-feeding. Naproti tomu mikrobiální síť rozkladačů ustavená v semiaridních podmínkách vykazuje sníženou citlivost vůči průběhu rozkladu a posun v metabolické aktivitě tohoto společenství je proto nesignifikantní. S nejvyšší pravděpodobností se tak děje kvůli nedostatku vody a substrátů, což má za následek vyšší metabolické náklady (Sommers et al., 1980; Stark a Firestone, 1995). Nicméně i v semiaridních oblastech byl zaznamenán cross-feeding, a to při posunu z počátečního do aktivního stadia rozkladu, nicméně na mnohem menší škále než v případě mikrobiální sítě lesa mírného podnebného pásu, která poskytuje měřitelnou odezvu mikroorganismů (fylogenetický obrat/turnover, potenciaální cross-feeding). I přesto se komunita rozkladačů ustavuje podle podobného vzorce bez ohledu na podmínky prostředí (Burcham et al., 2024).

Pro mikrobiální model PMI (přesnost v řádu dnů, ± 3 dny) lze na základě poznatků studie prováděné na lidském modelu (Burcham et al., 2024) uvažovat zástupce rodů *Peptostreptococcus*, *Sporosarcina* a třídy *Clostridia* (konkrétně *Clostridiales Family XI. Incertae Sedis*), které bylo možné detekovat v obou zkoumaných lokalitách (semiaridní step versus les mírného podnebného pásu), což naznačuje, že sice existují fluktuace závislé na klimatických podmínkách, nicméně rozklad v obou lokalitách vede k uskupení univerzální sítě mikroorganismů, z nichž se někteří vyskytují bez ohledu na podmínky prostředí.

Pochopení, schopnost predikce struktury a proměn v čase společenství mikrobiálních rozkladačů vede k praktickým aplikacím, mezi které patří metoda stanovení PMI na základě vzorců mikrobiální sukcese

(Burcham et al., 2024). Při ohledání mrtvoly během aktivního vyšetřování by mělo být zamezeno nadbytečné manipulaci s tělem, a proto by pro odběr mikroorganismů mohla být vhodná středoušní a nosní dutina (NIH HMP Working Group, 2009; Johnson et al., 2016). Takto se lze ale řídit v případě, pokud se tělo nenachází v pokročilém stadiu rozkladu a zároveň s mikrobiomem těla neinterferují mikroorganismy okolního prostředí, které by mohly poskytovat falešně pozitivní výsledky. Mimo forenzní vědy lze očekávat inovace v nakládání s lidskými (Spade, 2013) a zvířecími ostatky. Při chovu hospodářských zvířat může být problematické zabránit znečištění půdy během rozkladu mršin. Jako vhodným řešením je použití grampozitivní půdní bakterie *Corynebacterium glutamicum* urychlující rozklad živočišné tkáně (Hong et al., 2018).

5. Mikroorganismy a archeologické a antropologické výzkumy

5.1 Mikroorganismy v kryptách

Prostředí krypt je včetně uložených předmětů a ostatků kontaminováno různými mikroorganismy podílející se na dekompozici organické hmoty, mezi které se mimo bakterie řadí i mikroskopické houby, přičemž není vzácností při analýze vzorků detekovat i patogenní druhy těchto mikroorganismů. Příkladem může být *Aspergillus versicolor* běžně se vyskytující na lidských ostatcích a v ovzduší krypty, který produkuje vysoké dávky sterigmatocystinu, což je mykotoxin s ciliostatickým efektem (Jesenská a Bernát, 1994). V případě mikrobiologického výzkumu krypty v katedrále Nanebevzetí Panny Marie v Přemysli (Dražkowska et al., 2019) sice vzorky obsahovaly pouze nízké zastoupení patogenů, nicméně mikroorganismy kontaminující bioaerosol nebo lidské ostatky by teoreticky mohly u citlivých osob vyvolat alergickou reakci. Díky relativně suchému prostředí byly dominantní kontaminantou lidských ostatků hlavně xerofilní a keratinolytické houby a spory aerobních bakterií. Naproti tomu v bioaerosolu mikroorganismů suspendovaných ve vzduchu dominovaly nexerofilní houby a z hlediska zastoupení heterotrofních bakterií v bioaerosolu se kvalita ovzduší v kryptě s probíhající činností signifikantně zhoršovala, a to před i po sterilizaci krypty. Probíhající práce měly obdobný vliv i na zastoupení mezofilních bakterií, které bylo až stonásobně vyšší. β -hemolytické bakterie, které nebyly před zahájením prací detekované, se podařilo zajistit až po ukončení prací. Sterilizace krypty nezpůsobila v zastoupení nexerofilních a xerofilních hub významné změny, u mezofilních a β -hemolytických bakterií došlo k nepatrnému poklesu abundance.

Během pohybu v prostorách krypty došlo ke kontaminaci ochranných oděvů a pomůcek a současně abundance mikroorganismů na těchto površích se odvíjela od doby strávené v kryptě a typu činnosti. Nejvyšší kontaminace byla zaznamenána při půlhodinovém pobytu v kryptě, přičemž prováděnou činností bylo prosévání zeminy a sutí. Osoby, které se chystají provádět archeologické průzkumy právě v prostředí krypt, by měly být informovány o možných zdravotních rizicích. Zároveň je nutné při pohybu v těchto prostorách dodržovat přísná bezpečnostní opatření. Nutností je organizace

plánovaných prací tak, aby byla minimalizována expozice biologickým agens. Naprosto nezbytné jsou při práci v kryptách ochranné pomůcky, jako je jednorázové oblečení včetně bot, brýlí, masek nebo respirátorů, které by mělo být po ukončení prací dekontaminováno nebo zničeno, aby se zabránilo rozšíření mikroorganismů mimo archeologické prostory (Cox a Kneller, 2001).

5.2 Mikrobiální a lidská DNA uzavřená v zubním kameni

Zubní kámen vzniká v důsledku buněčné a mikrobiální adheze, která zprvu vede ke zformování biofilmu zubního plaku, jehož vzniku předchází tvorba lokálních ekosystémů, jež jsou schopné udržet integritu tohoto biofilmu. Většina tkání lidského těla podléhá neustálé buněčné obnově a odstraňování nefunkčních buněk, nicméně zuby této remodelaci nepodléhají, a proto představují relativně stabilní prostředí pro bakteriální kolonizaci. Zubní kámen je tedy výsledkem ukládání měkkého depozitu silně adherentního biofilmu, který následně mineralizuje. U člověka se lze setkat se dvěma typy zubního kamene, supragingiválním a subgingiválním. V kontrastu se zubním plakem, jehož měkké nánosy lze jednoduše odstranit správnou hygienou, se v případě zubního kamene nelze obejít bez profesionální asistence (White, 1991; Mann et al. 2018).

Zubní kámen představuje rezervoár starověké (ancient, aDNA) endogenní (lidské) a mikrobiální DNA, jelikož díky spontánním kalcifikacím uchovává poznatky o struktuře orálního mikrobiomu, životním stylu (strava, zdravotní stav apod.) nebo podmínkách prostředí, čímž umožňuje studovat souvislost těchto faktorů v průběhu evoluce nebo se způsobem života lidských populací (Kawano et al., 1995; de la Fuente et al., 2013; Mann et al. 2018). Odolnost zubního kamene reflektuje i jeho analýza v případě ostatků starých až 100 000 let a možnost rekonstruovat mikrobiální genomy v archeologickém kontextu, což má významné důsledky pro pochopení evoluce mikroorganismů asociovaných s člověkem (Klapper et al., 2023). Mikrobiální komunity uchované v zubním kameni jsou striktně derivované ze zubního plaku, zatímco v případě těch nalezených během analýzy ostatků v asociaci s dentinem, který je sterilní ante-mortem, je jejich složení řízeno stochasticky vlivem rozkladných procesů, a proto zahrnují kontaminující taxony původem z okolního prostředí. Naopak dentin oproti zubnímu kameni obsahuje více endogenní (lidské) DNA, která je zároveň méně fragmentovaná, nicméně platí, že celkový obsah získané DNA je mnohem vyšší v zubním kameni než v dentinu. Tento vyšší obsah celkové DNA v zubním kameni oproti dentinu pravděpodobně reflektuje rozdíly ve složení a struktuře těchto dvou materiálů ante-mortem a v průběhu rozkladných procesů (Mann et al., 2018).

Mechanismy, s jejichž pomocí je lidská DNA inkorporována do zubního kamene, nejsou dosud přesně známy, pravděpodobně ale zahrnují pasivní adsorpci ze slin a buněk povrchu orální mukózy, anebo aktivní inkorporaci díky imunitním reakcím. Zvýšená abundance působků imunitního systému v zubním kameni v kombinaci s morfologickými změnami značí onemocnění periodontu (Warinner et al., 2014; Mann et al. 2018).

Mikrobiální a lidská DNA zachovaná v zubním kameni představuje unikátní nástroj pro určení pohlaví, studium orálního mikrobiomu, paleopatologií nebo životního stylu a v případě nálezu recentních kosterních ostatků umožňuje i forenzní identifikaci obětí trestných činů, havárií nebo přírodních katastrof bez nutnosti destrukce dentálního nebo osteologického materiálu. Z (paleo)mikrobiologického, antropologického i forenzního hlediska představuje tato DNA cenný a dostupný zdroj informací (Kawano et al., 1995).

6. Mikroorganismy ve vyšetřování sexuálně motivovaných trestných činů

Možnost využití kožního mikrobiomu ve forenzní identifikaci s sebou přineslo další úvahy o tom, zda je možné aplikovat podobné postupy i v případě rozlišení jednotlivých tělních tekutin zajištěných na místě činu, konkrétně při vyšetřování sexuálně motivovaných trestných činů. Cílem řady studií bylo identifikovat mikrobiální markery specifické právě pro jednotlivé druhy tělních tekutin. Tato kapitola je zaměřena na biologické stopy, které lze zajistit v případě sexuálně motivovaného útoku, a bude zde podrobněji rozebrána problematika vaginálního sekretu, vaginálního mikrobiomu, penilního mikrobiomu a slin. Vzhledem k tomu, že v těchto případech lze rovněž zajistit i trichologický materiál v podobě vlasů a pubického ochlupení, je část kapitoly věnována i této problematice.

6.1 Vaginální mikrobiom

Je všeobecně známo, že ženský genitál podobně jako např. gastrointestinální trakt (GIT) obývá unikátní mikrobiom podílející se na normálním fungování lidského těla, nicméně vaginální mikrobiom podléhá řadě fluktuací a pouze u zlomku žen si zachovává stabilní podobu. Na složení vaginálního mikrobiomu má vliv např. menstruační cyklus, hygiena, bakteriální vaginóza, gravidita, antikoncepce, medikace (zejm. antibiotika), pohlavní styk (a používání prezervativu), a dokonce i etnická příslušnost (Hillier et al., 1993; Schwebke et al., 1999; Eschenbach et al. 2000; Eschenbach et al., 2001; Noyes et al. 2018).

Rod *Lactobacillus* je dominující součástí vaginálního mikrobiomu a některé jeho zástupce lze považovat za kandidáty pro forenzní využití, nicméně situaci zde komplikuje následek nerovnováhy v podobě bakteriální vaginózy, která vede ke snížení abundance zástupců rodu *Lactobacillus* ve prospěch jiných bakterií, jakou jsou např. *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae* nebo zástupci rodu *Prevotella*. Tyto bakterie lze zároveň v malém množství detekovat i ve zdravém vaginálním mikrobiomu, pokud se ale jejich abundance zvýší, představují riziko rozvoje bakteriální vaginózy. Takto narušený vaginální mikrobiom oproti tomu zdravému neobsahuje žádnou dominující komponentu a jedná se spíše o heterogenní směs bakteriálních taxonů, ve které mají jednotliví zástupci relativně nízkou abudanci (Fredricks et al., 2007; Oakley et al. 2008; Srinivasan et al. 2012).

Pro forenzní využití lze jako markery využít pouze ty mikroorganismy, které se vyskytují výhradně v konkrétní tělní tekutině. V případě rodu *Lactobacillus* tuto podmínku splňují druhy *L. crispatus* a *L. jensenii*, naproti tomu *L. gasseri* byl detekován zároveň v gastrické mukóze u obou pohlaví a *L.*

iners ve spermatu. Přítomnost bakterií ve spermatu oproti běžnému výskytu bakterií ve vaginálním sekretu pravděpodobně značí probíhající infekci (Kiessling et al., 2008). Společně s *L. crispatus* a *L. jensenii* lze za markery vaginálního sekretu považovat i *Atopobium vaginae*. Tyto tři mikroorganismy byly detekovány i ve vzorcích moči, jelikož často dochází ke kontaminaci moče mikroorganismy vaginálního sekretu. *Gardnerella vaginalis* podobně jako *L. gasseri* nebo *L. iners* nelze v žádném případě považovat za markery vaginálního sekretu, jelikož byla zjištěna jejich přítomnost u obou pohlaví, a to konkrétně v anální a gastrické mukóze. Některé studie do mikrobiálních markerů vaginálního sekretu řadí i *L. gasseri*, nicméně panuje shoda, že *L. crispatus* a *L. jensenii* lze považovat za mikrobiální markery s potenciálem pro forenzní použití (Fleming a Harbison, 2010; Ravel et al. 2011; Akutsu et al. 2012; Giampaoli et al. 2012; Choi et al. 2014).

6.2 Penilní mikrobiom

Podobně jako vaginální mikrobiom napomáhá mikrobiom penisu udržovat prostředí genitálu v přirozené rovnováze (Kiessling et al., 2008). Mezi populacemi mikroorganismů asociovaných s mužským genitálem dominují anaerobní a fakultativně anaerobní bakterie a jedná se např. o zástupce rodu *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Peptoniphilus*, *Anaerococcus*, *Porphyromonas*, *Finegoldia* nebo *Gardnerella* (Bowie et al., 1977; Zozaya et al. 2016; Dixon et al. 2023). U mužů, kteří podstoupili obřízku, lze považovat penilní mikrobiom za unikátní díky snížené vlhkosti v oblasti *sulcus coronalis*, což podporuje keratinizaci (Liu et al., 2013). Obřízka vede ke snížení abundance bakterií podílejících se na rozvoji bakteriální vaginózy a obecně vede k nahrazení anaerobních mikroorganismů aerobními populacemi, které vykazují nižší diverzitu a svým složením reflektují kožní mikrobiom (Gray et al. 2009; Price et al. 2010; Liu et al., 2015). Penilní mikrobiom oproti vaginálnímu vykazuje vyšší diverzitu, jeho složení je heterogenní. Vaginální mikrobiom naopak obsahuje méně taxonů, zato s vysokou abundancí.

Při zkoumání mikroorganismů asociovaných s genitálem a jejich potencionálního forenzního použití je třeba se zaměřit na složení typicky mužské/ženské genitální mikrobioty, mikrobiálních komunit předávaných během pohlavního styku a postkoitální mikrobioty u obou pohlaví. V postkoitálních mužských i ženských vzorcích byl zaznamenán nárůst počtu bakteriálních rodů. Nejvýraznější změna byla detekována v postkoitálních mužských vzorcích, ve kterých došlo ke zvýšení abundance rodu *Lactobacillus*, který je typickou dominantní složkou vaginálního mikrobiomu. V postkoitálních ženských vzorcích byla patrná značná disrupce vaginálního mikrobiomu, kterou by z forenzního hlediska bylo možné použít jako potvrzení, že k pohlavnímu styku skutečně došlo.

6.3 Mikrobiální transfer během pohlavního styku

V případě přenosu bakteriálních taxonů během pohlavního styku bylo možné odlišit dva unikátní mikrobiální transfery, a to muž-žena a žena-muž. Transfer muž-žena je charakteristický vyšší bakteriální diverzitou oproti transferu žena-muž, což je konzistentní s poznatky o taxonomické

heterogenitě penilního mikrobiomu. V ženských postkoitálních vzorcích byly detekovány rody *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Sutterella*, *Casaltella* a *Olegusella*, které se nevyskytovaly v ženských prekoitálních vzorcích. Jak již bylo naznačeno výše, penilní mikrobiom pravděpodobně interferuje s přirozeným vaginálním mikrobiomem a tento kontakt pravděpodobně vede u žen k rozvoji bakteriální vaginózy. Transfer žena-muž má v mužských postkoitálních vzorcích za následek (mimo již zmíněné zvýšené abundance zástupců rodu *Lactobacillus*) výskyt bakterií rodu *Neisseria* a *Clostridium*. Detekovatelné bakteriální transfery během pohlavního styku lze zaznamenat v případě, kdy nebyla použita bariérová antikoncepce, nicméně pohlavní styk sám o sobě má, bez ohledu na použití bariérové antikoncepce, vliv na stabilitu mikrobiomu u obou pohlaví. I když se studium problematiky mikrobiálního otisku pro potřeby forenzní identifikace zdá slibné, s nejvyšší pravděpodobností nenahradí analýzu STR, nicméně zmíněné poznatky mohou asistovat v případech, kdy analýza STR selhala ve vygenerování kvalitního profilu (Liu et al. 2015; Nye, 2020; Dixon et al., 2023).

6.4 Sexuálně přenosné infekce

Využití původců sexuálně přenosných infekcí (SPI) ve vyšetřování sexuálně motivované trestné činnosti reflektuje případ zneužívání dítěte, kdy pachatelem byl dospělý muž infikovaný *Neisseria gonorrhoeae*. Podezřelý odmítl podstoupit invazivní odběr vzorku z urogenitálního traktu vyžádaný policií, nicméně musel poskytnout své spodní prádlo pro potřeby forenzní analýzy, která odhalila přítomnost gonokokálně-specifické DNA. Vzorky podezřelého a oběti byly osekvenovány a ukázalo se, že oba s nejvyšší pravděpodobností pochází ze společného zdroje. I kdyby bylo dokázáno, že se nejedná o identické izoláty, stále by šlo o důkaz sexuálního zneužití dítěte, přičemž by ale nebyl prokázán přímý kontakt s tímto konkrétním podezřelým.

Jelikož jsou prediktivní hodnoty inherentně závislé na prevalenci infekce, odhaduje se, že právě kvůli nízké prevalenci výskytu *Chlamydia trachomatis* a *N. gonorrhoeae* v dětské populaci lze předpokládat, že test potvrzující přítomnost takového onemocnění u dítěte, které se pravděpodobně stalo obětí zneužívání, byl vygenerován na základě falešně pozitivního výsledku. Vzhledem k tomu, že jakýkoli test může poskytnout takový výsledek, doporučuje se, aby při získání pozitivního výstupu bylo rutinně provedeno dodatečné otestování, a to zejména v populacích s nízkou prevalencí konkrétního sexuálně přenosného onemocnění (Martin et al., 2007; Black et al., 2009; Workowski et al., 2021).

Na SPI je možné nahlížet i jako na prostředek, díky kterému lze úmyslně způsobit újmu druhé osobě. Příkladem může být weaponizace viru HIV-1 a hepatitidy C (HCV) gastroenterologem, který v roce 1994 pod falešnou záminkou své bývalé přítelkyni intramaskulárně aplikoval směs krve HIV a HCV pozitivních pacientů. Tento lékař byl uznán vinným z pokusu vraždy druhého stupně (Metzker et al., 2002). Zdaleka se ale nejedná o první případ použití fylogenetické analýzy HIV při vyšetřování. Již na počátku 90. let minulého století byla zaznamenána tzv. nosokomiální transmise HIV, kdy zubní lékař prováděl na svých pacientech standardní zákroky, ačkoli si byl vědom, že je HIV pozitivní. Byla

provedena fylogenetická analýza vzorků zubaře, pacientů a kontrol získaných od HIV pozitivních osob z dané lokality. U pěti pacientů bylo dokázáno propojení s nakaženým lékařem. Během invazivních procedur u těchto pacientů mohlo teoreticky dojít ke kontaktu s krví lékaře nebo byly jeho krví kontaminovány používané nástroje (Ou et al.). Tyto kazuistiky v žádném případě nepředstavují ojedinělé případy, např. již v roce 1991 ve stejném státě jiný HIV pozitivní zubař také nakazil své pacienty (Jaffe et al., 1994). HIV lze podobně jako *N. gonorrhoeae* a *C. trachomatis* rovněž použít při vyšetřování sexuálního zneužívání dětí nebo při znásilnění (Banaschak et al., 2000). Úmyslné šíření viru HIV bylo zaznamenáno i na konci osmdesátých let v Československu, kdy mladý muž, i přes to, že si byl vědom, že je HIV pozitivní, nadále udržoval intimní vztahy a infekci dál šířil. Šlo o vůbec první případ svého druhu na našem území a v září roku 1988 byl mladík obviněn z ublížení na zdraví a odsouzen k trestu 8 let odnětí svobody, nicméně však byl na základě amnestie v roce 1989 propuštěn na svobodu (Štoček a Bechynková, 2023). V současnosti je tato problematika v trestním zákoníku ukotvena v § 152 (Šíření nakažlivé lidské nemoci) a § 153 (Šíření nakažlivé lidské nemoci z nedbalosti).

6.5 Trichologický materiál

V případě sexuálně motivovaného útoku lze dále zajistit vlasy (skalp) a pubické ochlupení poskytující specifický mikrobiální profil. Podobně i lidské vlasy charakterizuje určitý mikrobiom, nicméně se v tomto případě silně uplatňuje vliv prostředí, což vede k výskytu tzv. tranzientních bakterií, kterých je u žen dokonce dvojnásobně více než u mužů, pravděpodobně vlivem péče a častějších kosmetických zásahů (odbarvování, barvení, styling apod.), což zamezuje ustavení stabilních mikrobiálních komunit. K propojení pachatele a oběti lze vedle mikrobiální analýzy pubického ochlupení analogicky použít mikrobiální analýzu tříselní oblasti (Tridico et al., 2014; Kumari et al., 2022).

Je nepravděpodobné, že by došlo k vytvoření databáze mikrobiomů pubického ochlupení dostupné pro porovnávání zajištěného materiálu, nicméně bylo dokázáno, že složení mikrobiomu pubického ochlupení koreluje se složením kožního mikrobiomu (Grice et al., 2009; Williams a Gibson, 2019). Konkrétně se jedná o zástupce kmenů *Actinobacteria* (rody *Corynebacterium* a *Propionibacterium*), *Firmicutes* (rody *Staphylococcus* a *Lactobacillus*) a *Proteobacteria* s tím, že na rodové úrovni byla na základě OTU zaznamenána odlišná abundance mezi pohlavími. Rod *Corynebacterium* vykazuje vyšší abundanci u mužů než u žen. Opačná situace v případě rodu *Lactobacillus* je konzistentní se studii zabývajícími se mikrobiálním složením vaginálního sekretu a penilního mikrobiomu s cílem potvrdit, že mikroorganismy lze použít pro identifikaci tělních tekutin a při vyšetřování sexuálně motivovaných trestných činů (Fleming a Harbison, 2010; Ravel et al., 2011; Akutsu et al., 2012; Giampaoli et al., 2012; Choi et al., 2014; Doi et al., 2014; Williams a Gibson, 2017; Williams a Gibson, 2019; Nye, 2020; Dixon et al., 2023).

6.6 Sliny

V případě útoku se sexuálním podtextem se zevní ohledání těla mnohdy považuje za důležitější než výsledek samotné pitvy. Často se lze v těchto případech setkat s různými typy poranění, jako jsou např. kousance, škrábance, oděrky, odřeniny, stopy rdoušení apod. Pomineme-li v případě kousanců jejich význam pro forenzní odontologii, poskytují zároveň i vzorek slin (Saukko a Knight, 2004). Přítomnost slin se tradičně ověřuje pomocí α -amylázy, ačkoli byla zjištěna nižší hladina tohoto enzymu i v jiných tělních tekutinách, např. v krvi nebo ve spermatu. V případě onemocnění slinivky se se zvýšenou hladinou α -amylázy lze setkat mimo krve i v moči. Mnohdy se na místě činu nebo ve vzorcích zajištěných z těla oběti nachází mix několika tělních tekutin, a pokud je podíl kontaminující složky (zejm. krve) vysoký, klesá specifická aktivita α -amylázy (Willott, 1974; Tsutsumi et al., 1991).

Podobně jako v případě vaginálního sekretu lze i pro průkaz slin využít mikroorganismy, jelikož ústní dutinu podobně jako genitál obývá charakteristický mikrobiom. Pomocí specifického složení ústního mikrobiomu je teoreticky možné mimo samotný průkaz slin použít tyto poznatky i pro účely forenzní identifikace v případě, kdy nelze provést analýzu DNA vzhledem k nevyhovujícímu stavu biologického materiálu nebo u homozygotních dvojčat (Bozza et al., 2022). Za mikrobiální marker slin lze díky vysoké abundanci považovat *Streptococcus salivarius*. Ačkoli může být abundance tohoto druhu snížena vlivem ústní hygieny nebo onemocnění, byl jeho výskyt detekován i v případě zubního kazu, pyorrhea alveolaris, po čištění zubů nebo konzumaci kávy. Za markery slin lze dále považovat i *S. sanguinis* nebo *Neisseria subflava* (Krasse, 1954; Nakanishi et al. 2011; Jung et al., 2018).

7. Mikroorganismy ve vyšetřování náhlých úmrtí

7.1 Syndrom náhlého úmrtí kojence

Na mezinárodní konferenci v Seattlu byla v roce 1969 vyslovena definice SIDS, podle níž se jedná o náhlé úmrtí kojence nebo dítěte nízkého věku, kdy pitva nedokáže odhalit odpovídající příčinu smrti (Beckwith, 1970). Později byla doplněna i o nutnost ohledání místa úmrtí a dále rozdělena na 3 kategorie podle věku, rodinné historie SIDS a odhalení petechiálních hemoragií, zánětlivých ložisek nebo jiných abnormalit při pitvě (Willinger et al., 1991; Beckwith, 1993). V roce 2004 byla definice SIDS zkonkretizována do následující podoby: k náhlému úmrtí kojence (stáří <1 rok) dochází pravděpodobně ve spánku v důsledku smrtelné události, která zůstává i po důkladném ohledání, provedení kompletní pitvy, přezkoumání zdravotní anamnézy a možných okolností úmrtí nevysvětlena (Krous et al., 2004).

Již v polovině 70. let minulého století byly snahy o odhalení příčiny SIDS a prověřovány desítky různých teorií, jako např. alergie na proteiny kravského mléka, deficiencie řady biogenních prvků, vitamínů nebo nutrientů, otrava oxidem uhelnatým, pronační spánková poloha, nedostatečná nebo

naopak nadměrná produkce plicního surfaktantu, ale také botulismus nebo virové a bakteriální infekce (Saukko a Knight, 2004), a proto lze tuto problematiku zkoumat i z pohledu forenzní mikrobiologie. Fakt, že je vyšetřování náhlého úmrtí kojence bez zjevné příčiny velmi složité, dokazuje obvinění Sally Clark z vraždy vlastních synů (stáří 11 a 8 týdnů), která byla 9. 11. 1999 odsouzena k trestu odnětí svobody na doživotí. Rozsudek byl zrušen až na základě druhého odvolacího řízení v lednu 2003, kdy vyšlo najevo, že státnímu zástupci i obhájci byl poskytnut pitevní protokol, ve kterém soudní lékař v případě osmítýdenního miminka opomněl uvést, že příčinou úmrtí byla sepsa způsobená bakterií *Staphylococcus aureus*. Na základě fatálního selhání soudního lékaře a zároveň i zkreslené interpretace statistických dat strávila nevinná žena více než 3 roky ve vězení (R v Clark, 2003; Byard, 2004).

Většina kojenců je kolonizována *S. aureus*, který je běžnou součástí mikrobiomu kůže a sliznice nosohltanu, nicméně k SIDS dochází pouze ve zlomku případů. Příčinou úmrtí teoreticky může být pyrogenní toxin této bakterie, který je funkční v teplotním rozmezí 37 °C až 40 °C. Teplota v nosohltanu je ale fyziologicky nižší díky průchodu vzduchu přes mukózní povrchy. Mezi faktory, které mohou zvýšit teplotu mukózních povrchů na hodnotu permissivní pro pyrogenní toxin, resp. nad 37 °C, což mimo uvolnění toxinu vede i k přemnožení bakterie, se řadí např. infekce horních cest dýchacích nebo pronační spánková poloha (Molony et al. 1996; Molony et al., 1999; Zorgani et al., 1999). Mezi mikroorganismy, zkoumané v souvislosti s hledáním příčiny SIDS se mimo *S. aureus* řadí i *Escherichia coli*, a to zejména sérotypy asociované s extraintestinálními infekcemi (Pearce et al., 2010). Dále se v souvislosti se SIDS často uvádí i bakteriální původci řady onemocnění, jako např. *Bordetella pertusis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae* nebo *Haemophilus influenzae*, jelikož mezi druhým a čtvrtým měsícem života bývají kojenci proti nim očkováni, nicméně na základě stanoviska Centres for Disease Control and Prevention (CDC) neexistuje žádné propojení mezi vakcinací a SIDS.

Při vyšetřování možné mikrobiální příčiny náhlého úmrtí je nutné brát v potaz PMI a stadium rozkladu. Jak již bylo rozebráno v kapitole Role mikroorganismů ve stanovení post-mortem intervalu, v mrtvole se vlivem posmrtných změn ustavuje tzv. thanatomikrobiom, kdy mikrobiální komunity přirozeně se vyskytující v trávicí soustavě pronikají do vnitřních orgánů a do krve. Tělo mohou dále kolonizovat i mikroorganismy vyskytující se v okolním prostředí, a proto je zásadní při odběru nebo vlastní analýze vzorku zabránit jeho kontaminaci vedoucí k falešně pozitivním výsledkům a zkreslené interpretaci získaného důkazního materiálu.

8. Mikroorganismy a forenzní toxikologie

Jak již bylo uvedeno v předešlé kapitole, během prvních 24 hodin od okamžiku smrti dochází k průniku bakterií GIT do krevního oběhu a orgánů (viz thanatomikrobiom). Proto bývají vzorky krve odebrané při pitvě většinou kontaminovány bakteriemi, které jsou součástí přirozené ante-mortem mikroflóry a současně i exogenními mikroorganismy původem z prostředí. Vzhledem k post-mortem mikrobiální

kolonizaci může být interpretace výsledků toxikologické analýzy obtížná. V této kapitole bude podrobněji rozebráno, jak mikroorganismy ovlivňují post-mortem hladinu ethanolu a γ -hydroxymáselné kyseliny (GHB).

8.1 Ethanol

Ethanol je produkován post-mortem díky kvasinkám a bakteriím a zároveň i metabolizován pomocí *Serratia marcescens* a bakteriemi z rodu *Pseudomonas*, čímž dochází k nárůstu/poklesu jeho obsahu v krvi odebrané během pitvy. (Bonnichsen et al., 1953; Dick a Stone, 1987). Mimo ethanolu vznikají činností mikroorganismů nestálé látky, jako je např. 1-propanol, isobutanol, 2-methyl-1-butanol nebo 3-methyl-2-butanol, které teoreticky mohou sloužit jako biomarkery mikrobiální produkce ethanolu (Boumba et al., 2012). Pokud je příčinou smrti akutní intoxikace alkoholem, lze v krvi naměřit v průměru 0,36 g/100 ml ethanolu (Jones a Holmgren, 2003; Koski et al., 2003). V případě, že byl přítomný ethanol produktem bakteriální fermentace post-mortem, a nikoli výsledkem konzumace alkoholu, byly naměřeny různé hodnoty, např. <0,03 g/100 ml, ale také 0,19 g/100 ml, a dokonce až 0,22 g/100 ml v souvislosti se zvláště traumatickými a devastujícími poraněními (letecké a dopravní nehody), kdy nebyl k dispozici důkaz o požití alkoholu ante-mortem (Zumwalt et al., 1982; Mayes et al., 1992). Problematická interpretace post-mortem naměřeného obsahu ethanolu je často spojována s leteckými a dopravními nehodami, kdy je vzhledem k devastujícím poraněním, stavu ostatků a většinou i k pokročilému stadiu rozkladu prakticky nemožné získat reprezentativní vzorky tkání nebo tělních tekutin (Blackmore, 1968), nicméně k endogenní produkci ethanolu může docházet i relativně krátce od okamžiku smrti, pokud je zvýšena okolní teplota (Bonnichsen et al., 1953; Al-Asmari et al., 2022).

Pro správný výklad post-mortem obsahu ethanolu v krvi je nutné vzít v potaz řadu faktorů, mezi které se řadí stadium rozkladu, PMI, lokalita nálezu těla, vnější podmínky (teplota) a zdravotní stav zemřelého (diabetes mellitus nebo jiné onemocnění, abusus drog apod.). Post-mortem produkce ethanolu byla v případě nálezu těla ve vnějším prostředí vyšší než v případě úmrtí v interiéru (např. v nemocnici nebo bytě), nicméně hladiny potencionálních biomarkerů ethanolu, ethyl glukuronidu (EtG) a ethyl sulfátu (EtS) zůstaly stabilní v obou situacích. Pokud se tělo nachází v pokročilém stadiu rozkladu, lze předpokládat, že vzorky tělních tekutin již nebudou ve stavu vhodném pro kvalitní analýzu. Tehdy je preferováno využít vzorky samotné tkáně. Bylo dokázáno, že EtG a EtS napomáhají odhalit původ ethanolu i v případě, že došlo k jeho post-mortem produkci díky fermentujícím mikroorganismům (Al-Asmari et al., 2022). Při vyhodnocování přítomnosti ethanolu zejména pomocí EtG je nutné brát v potaz výše popsané faktory, jelikož dřívější studie dokázaly, že EtG může přinášet falešně negativní i falešně pozitivní výsledky (Helander et al. 2007; Høiseth et al., 2008).

Post-mortem produkce ethanolu probíhá ve všech tělních tekutinách, a to včetně sklivcové i přes to, že je díky své anatomické izolaci považována za nedostupnou bakteriím kolonizující tělo post-mortem. Pokud dojde ke kontaminaci vzorku sklivcové tekutiny bakteriemi, může být i v ní naměřen obsah ethanolu, který je výsledkem mikrobiální fermentace, jelikož se zde přirozeně vyskytuje glukóza. Fyziologická koncentrace glukózy ve sklivcové tekutině je vždy nižší než v krvi, a naopak zvýšená koncentrace glukózy oproti krvi značí hyperglykémii související s diabetes mellitus. Analýza sklivcové tekutiny je vhodnou alternativou analýzy vzorků krve při stanovování obsahu ethanolu v lidském těle post-mortem, což dokazuje i to, že reflektuje obsah ethanolu detekovaný ve *vena femoralis* (Lundquist et al., 1994; Sylvester et al., 1998; Olsen a Hearn, 2003; Al-Asmari et al. 2022).

Problematickou interpretaci naměřených hodnot obsahu ethanolu lze popsat na tragické explozi, jež se odehrála na bitevní lodi USS Iowa a vyžádala si 47 obětí. Těla vykazovala termická poškození, tupá poranění a vzhledem ke kontaktu s vodou i pokročilé stadium rozkladu. U 23 obětí byla zjištěna přítomnost ethanolu v krvi a naměřené hodnoty se pohybovaly v intervalu od 0,01 do 0,19 g/100 ml, přitom nejčastěji bylo zaznamenáno v průměru <0,03 g/100 ml. U většiny případů pozitivního testu na ethanol v krvi byl současně zaznamenán negativní nálezný v moči, sklivcové tekutině, žluči nebo ve vzorcích ledvinné a mozkové tkáně, což naznačuje, že naměřený obsah ethanolu v krvi byl výsledkem činnosti mikroorganismů a k jeho vzniku došlo pravděpodobně při transportu a skladování krevních vzorků před samotnou analýzou (USS Iowa investigation team, 1991; Mayes et al., 1992). Jako další příklad lze uvést úmrtí muže, jehož tělo bylo nalezeno pod nánosem dřevěných třísek. Příčinou úmrtí bylo udušení v důsledku obstrukce dýchacích cest dřevěnými štěpy. Během prvních 24 hodin od smrti začaly bakterie vdechnutý materiál fermentovat a ve výsledku byla zaznamenána nezvyklá endogenní produkce ethanolu v plicích (v levé plicí bylo naměřeno 0,571 mg/g ethanolu) a jeho difuze do kardiovaskulárního systému (Furumiya et al., 2011).

K endogenní produkci ethanolu může docházet i ante-mortem v případě syndromu střevní fermentace, (auto-brewery syndrom, „syndrom vlastního pivovaru“), což je vzácné onemocnění s příznaky silné intoxikace alkoholem, kdy abnormální činnost mikrobiomu GIT vede k produkci ethanolu v důsledku příjmu sacharidů v potravě (Kaji et al., 1976). Problematika endogenní produkce ethanolu mikrobiomem GIT byla známa již v první polovině minulého století (Ladkin a Davies, 1948), nicméně nedávno byl podobný fenomén popsán i v případě mikrobiomu ústní dutiny a močového traktu, a proto by existence tohoto syndromu měla být respektována při orientační dechové zkoušce na přítomnost alkoholu nebo stanovování obsahu ethanolu v moči (Kruckenberg et al., 2020; Smędra et al., 2022).

8.2 γ -Hydroxymáselná kyselina

γ -Hydroxymáselná kyselina (GHB) je látka používaná v léčbě narkolepsie (Broughton a Mamelak, 1979), nicméně je mimo svůj terapeutický účinek též zneužívána jako omamná látka a sedativum

a společně s ketaminem a rohypnolem se řadí mezi tzv. date rape drugs (Lyman et al., 1998). Současně se GHB přirozeně vyskytuje v lidském těle a její koncentrace dosahují hodnot pod 10 mg/l v moči a 4 mg/l v plazmě (Awapara et al., 1950; Yeatman a Reid, 2003; Andresen et al., 2010). Po požití GHB mohou být její koncentrace v moči a plazmě 100-1000x vyšší, nicméně díky rychlému metabolismu a exkreci GHB se tyto zvýšené hodnoty vrací na úroveň těch přirozených, a to během 8 až 12 hodin po aplikaci (Kavanagh et al., 2010). Na koncentraci GHB má vliv délka intervalu mezi incidentem a odběrem vzorku, typ konzervačních látek, doba uchovávání vzorků v konkrétní teplotě a anamnéza osoby poskytující vzorek, a to zejm. onemocnění, geneticky podmíněné vady, současná medikace, a dokonce i strava (Jakobs et al., 1981; LeBeau et al., 2000; Kerrigan, 2002; Andresen et al., 2010; Kavanagh et al., 2010). Do povědomí veřejnosti se tato látka dostala v 90. letech minulého století, kdy byla v USA zaznamenána „epidemie“ zneužívání GHB související i s její nenákladnou výrobou. Tato situace vyústila v legislativu známou jako Hillory J. Farias and Samantha Reid Date-Rape Drug Prohibition Act of 2000 (Public Law 106-72). Tento zákon se inspiroval tragickým úmrtím teprve patnáctileté Samantha Reid v důsledku předávkování GHB, která jí byla přidána do nápoje, aniž by o tom věděla (Lloyd, 2002).

Interpretace naměřených koncentrací GHB v post-mortem biologických vzorcích je extrémně náročná disciplína forenzní toxikologie, jelikož bylo prokázáno, že endogenní hodnoty získané během pitvy jsou mnohem vyšší než ty, které byly odebrané ante-mortem (Busardò a Jones, 2015). Studie z roku 2004 jako možné vysvětlení představuje mikrobiální produkci GHB pomocí *Pseudomonas aeruginosa* nebo *Clostridium aminobutyricum*, kdy obě tyto bakterie dokážou konvertovat neurotransmitter GABA na GHB (Elliott et al., 2004). Studie z roku 2009 se zaměřila na možnou úlohu reziduálních enzymů v tvorbě GHB během rané post-mortem fáze porovnáním koncentrace GHB v ohořelých a neořelých mrtvolách. V případě ohořelých mrtvol bylo post-mortem produkci GHB zabráněno vlivem denaturace potřebných enzymů (Eli a Cattabeni, 1983; Nishimura et al., 2009). GHB je pravděpodobně produkována v intervalu mezi smrtí a samotnou pitvou, a nikoli během uložení vzorků v chladicích zařízeních před vlastní analýzou. Pravděpodobným důvodem vyšší post-mortem koncentrace GHB může být enzymatická konverze sukcinátu, GABA a putrescinu. Bakterie by teoreticky mohly přispívat konverzí glukózy na sukcinát přes fosfoenolpyruvát a oxalacetát. Sukcinát je konvertován na sukcinát semialdehyd, který podléhá redukci za vzniku GHB (Gottschalk, 1986; Marinetti, 2001; Moriya a Hashimoto, 2004). I přes tyto poznatky prozatím žádná studie nepřinesla přesvědčující důkaz o tom, že za zvýšenou post-mortem koncentrací GHB jsou zodpovědné mikroorganismy, a proto je třeba v tomto směru uskutečnit další výzkumy (Kietzerow et al., 2020; Kumfao et al., 2022).

Závěr

Cílem bakalářské práce bylo popsat, jak se obor forenzní mikrobiologie vyvíjel od okamžiku svého vzniku v odpovědi na antraxové útoky ze září a října 2001, se zaměřením na jednotlivé aplikace této forenzní disciplíny. Zpočátku v analýze mikrobiálního důkazního materiálu figurovala MLVA (Aum Shinrikyo), jež byla během vyšetřování Amerithraxu nahrazena celogenomovým sekvenováním a komparativními analýzami, které umožnily identifikaci na úrovni jednotlivých izolátů, což bylo pro odhalení zdroje *B. anthracis* naprosto zásadní. Nicméně byla nutná předchozí kultivace kolonií vyrostlých ze zajištěných spor.

Dnes je díky sekvenování nové generace (NGS) a metabarkódování 16S rRNA možné analyzovat i mikroorganismy, které dosud nebylo možné kultivovat v laboratorních podmínkách. Pro vyšetřování některých případů, mezi něž se řadí například zneužívání v rodině, již nestačí aktuálně používané metody identifikace osob pomocí unikátního genetického profilu na základě krátkých tandemových repetitiv (STR). V tomto konkrétním případě se lze orientovat buď pomocí sexuálně přenosných infekcí (SPI) nebo personalizovaného mikrobiomu genitálu, pubického ochlupení, kůže apod.

Při výběru jednotlivých aplikací forenzní mikrobiologie jsem použila publikace *Microbial Forensics* (Budowle et al., 2011) a *Forensic Microbiology* (Carter et al., 2017). U všech kapitol v této práci jsem ve zkratce popsala základ diskutované problematiky, který jsem propojila s recentními poznatky. Bioterrorismu, roli mikroorganismů v rozkladu anebo použití kožního mikrobiomu v individuální identifikaci byla během posledních let věnována značná pozornost. Naproti tomu ve využití mikroorganismů v interpretaci výsledků forenzní toxikologické analýzy nebo jako možné příčiny SIDS je situace opačná. V tomto směru je třeba nových poznatků.

Nová a jako slibná se jeví asistence mikrobiologie včetně SPI ve vyšetřování sexuálně motivované trestné činnosti, monitorování životního prostředí s cílem včasného odhalení potencionálních biologických hrozeb a v neposlední řadě inovativní využití mikroorganismů v archeologických a antropologických výzkumech. Během svého dalšího studia bych se chtěla věnovat právě kombinaci forenzní mikrobiologie a antropologie, jak z historického, tak i kriminalistického pojetí.

Seznam použité literatury

- Akutsu, T., Motani, H., Watanabe, K. *et al.*, 2014. Detection of bacterial 16S ribosomal RNA genes for forensic identification of vaginal fluid. *Legal Medicine* 14, 160-162.
- Al-Asmari, A.I., Altowairgi, M.M., Al-Amoudi, D.H., 2022. Effects of postmortem interval, putrefaction, diabetes, and location of death on the analysis of ethyl glucuronide and ethyl sulfate as ethanol biomarkers of antemortem alcohol consumption. *Forensic Science International* 335, 111280.
- Amendt, J., Campobasso, C.P., Gaudry, E. *et al.*, 2006. European Association for Forensic Entomology. Best practice in forensic entomology - standards and guidelines. *International Journal of Legal Medicine* 121, 90-104.
- Amerithrax Investigative Summary, 19. 2. 2010. Released pursuant to the freedom of information act. The United States Department of Justice. <https://www.justice.gov/archive/amerithrax/docs/amx-investigative-summary.pdf>
- Andresen, H., Sprys, N., Schmoldt, A. *et al.*, 2010. Gamma-hydroxybutyrate in urine and serum: Additional data supporting current cut-off recommendations. *Forensic Science International* 200, 93-99.
- Anthrax in Humans and Animals, 2008. 4th. Geneva: World Health Organization. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK310486/>
- Ashe, E.C., Comeau, A.M., Zejdlik, K. *et al.*, 2021. Characterization of bacterial community dynamics of the human mouth throughout decomposition via metagenomic, metatranscriptomic, and culturing techniques. *Frontiers in Microbiology* 12, 689493.
- Awapara, J., Landua, A.J., Fuerst, R. *et al.*, 1950. Free gamma-aminobutyric acid in brain. *Journal of Biological Chemistry* 187, 35-39.
- Banaschak, S., Werwein, M., Brinkmann, B. *et al.*, 2000. Human Immunodeficiency Virus type 1 infection after sexual abuse: Value of nucleic acid sequence analysis in identifying the offender. *Clinical Infectious Diseases* 31, 1098-1100.
- Beckwith J.B., 1993. A proposed new definition of Sudden Infant Death Syndrome. Second SIDS International Conference. Perinatology Press, 421-424.
- Beckwith, J.B., 1970. Sudden Infant Death Syndrome: Proceedings of the Second International Conference on Causes of Sudden Death in infants. University of Washington Press.

Benbow, M.E., Lewis, A.J., Tomberlin, J.K. *et al.*, 2013. Seasonal necrophagous insect community assembly during vertebrate carrion decomposition. *Journal of Medical Entomology* 50, 440-450.

Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D. *et al.*, 2020. Microbiome definition re-visited: Old concepts and new challenges. *Microbiome* 8, 119.

Black, C.M., Driebe, E.M., Howard, L.A. *et al.*, 2009. Multicenter study of nucleic acid amplification tests for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in children being evaluated for sexual abuse. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 28, 608-613.

Blackmore D.J., 1968. The bacterial production of ethyl alcohol. *Journal of the Forensic Science Society* 8, 73-78.

Bonnichsen, R., Halstrøm, F., Møller, K.O. *et al.*, 1953. Development of ethanol in blood samples and human organs during forensic chemical practice. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, 9, 352-361.

Boumba, V.A., Economou, V., Kourkoumelis, N. *et al.*, 2012. Microbial ethanol production: Experimental study and multivariate evaluation. *Forensic Science International* 215, 189-198.

Bouslimani, A., Porto, C., Rath, C.M. *et al.*, 2015. Molecular cartography of the human skin surface in 3D. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 2120-2129.

Bowie, W.R., Pollock, H.M., Forsyth, P.S. *et al.*, 1977. Bacteriology of the urethra in normal men and men with nongonococcal urethritis. *Journal of Clinical Microbiology* 6, 482-488.

Bozza, S., Scherz, V., Greub, G. *et al.*, 2022. A probabilistic approach to evaluate salivary microbiome in forensic science when the Defense says: 'It is my twin brother'. *Forensic Science International: Genetics* 57, 102638.

van Bronswijk, J.E.M.H., 1981. *Dust. House dust biology: For allergists, acarologists and mycologists* 1st, 41-42. NIB publishers.

Broughton, R., Mamelak, M., 1979. The treatment of narcolepsy-cataplexy with nocturnal gamma-hydroxybutyrate. *Canadian Journal of Neurological Sciences* 6, 1-6.

Budowle, B., Schutzer, S.E., Einseln, A. *et al.*, 2003. Public health. Building microbial forensics as a response to bioterrorism. *Science* 301, 1852-1853.

Budowle, B., Breeze, R.G., Schutzer, S.E. *et al.*, 2011. *Microbial Forensic* 2nd. Academic Press.

Burcham, Z.M., Belk, A.D., McGivern, B.B. *et al.*, 2024. A conserved interdomain microbial network underpins cadaver decomposition despite environmental variables. *Nature Microbiology* 9, 595-613.

- Busardò, F.P., Jones, A.W., 2015. GHB pharmacology and toxicology: Acute intoxication, concentrations in blood and urine in forensic cases and treatment of the withdrawal syndrome. *Current Neuropharmacology* 13, 47-70.
- Bush, L.M., Abrams, B.H., A. Beall, A. *et al.*, 2001. Index case of fatal inhalational anthrax due to bioterrorism in the United States. *New England Journal of Medicine* 345, 1607-1610.
- Byard R.W., 2004. Unexpected infant death: lessons from the Sally Clark case. *The Medical Journal of Australia* 181, 52-54.
- Byrd, J.H., Castner, J.L., 2001. Estimating the postmortem interval. *Forensic entomology: The utility of arthropods in legal investigations* 1st, 268. CRC Press.
- Can, I., Javan, G.T., Pozhitkov, A.E. *et al.*, 2014. Distinctive thanatomicrobiome signatures found in the blood and internal organs of humans. *Journal of Microbiological Methods* 106, 1-7.
- Carter, D.O., Tibbet, M., 2008. Does repeated burial of skeletal muscle tissue (*Ovis aries*) in soil affect subsequent decomposition? *Applied Soil Ecology* 40, 529-535.
- Carter, D.O., Tomberlin, J.K., Benbow, M.E. *et al.*, 2017. *Forensic Microbiology*. Wiley.
- Cobaugh, K.L., Schaeffer, S.M., DeBruyn, J.M., 2015. Functional and structural succession of soil microbial communities below decomposing human cadavers. *PloS one* 10, e0130201.
- Costello, E.K., Lauber, C.L., Hamady, M. *et al.*, 2009. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science* 326, 1694-1697.
- Cox, M., Kneller, P., 2001. *Crypt Archaeology: An approach* 1st, 16. Institute of Field Archaeologists.
- Dangerfield, C.R., Frehner, E.H., Buechley, E.R. *et al.*, 2020. Succession of bacterial communities on carrion is independent of vertebrate scavengers. *PeerJ* 8, e9307.
- Daughton, C.G., 2001. Illicit drugs in municipal sewage. Pharmaceuticals and personal care products in the environment, *ACS Symposium Series* 791, 348-364. American Chemical Society.
- de la Fuente, C., Flores, S.V., Moraga, M., 2013. DNA from human ancient bacteria: A novel source of genetic evidence from archaeological dental calculus. *Archaeometry* 55, 767-778.
- DeBruyn, J.M., Hoeland, K.M., Taylor, L.S. *et al.*, 2021. Comparative decomposition of humans and pigs: soil biogeochemistry, microbial activity and metabolomic profiles. *Frontiers in Microbiology* 11, 608856.

- Dick, G.L., Stone, H.M., 1987. Alcohol loss arising from microbial contamination of drivers' blood specimens. *Forensic Science International* 34, 17-27.
- Dimitriu, P.A., Iker, B., Malik, K. *et al.*, 2019. New insights into the intrinsic and extrinsic factors that shape the human skin microbiome. *MBio* 10.
- Dixon, R., Egan, S., Hughes, S. *et al.*, 2023. The Sexome - A proof of concept study into microbial transfer between heterosexual couples after sexual intercourse. *Forensic Science International* 348, 111711.
- Doi, M., Gamo, S., Okiura, T. *et al.*, 2014. A simple identification method for vaginal secretions using relative quantification of *Lactobacillus* DNA. *Forensic Science International: Genetics* 12, 93-99.
- Drażkowska, A., Swiontek Brzezinska, M., Deja-Sikora, E. *et al.*, 2019. Microbiological hazards associated with archaeological works, illustrated with an example of Fredro crypt (Przemysł, Poland). *Collegium Antropologicum* 43, 61-68.
- Eli, M., Cattabeni, F., 1983. Endogenous gamma-hydroxybutyrate in rat brain areas: Postmortem changes and effects of drugs interfering with gamma-aminobutyric acid metabolism. *Journal of Neurochemistry* 41, 524-530.
- Elliott, S., Lowe, P., Symonds, A., 2004. The possible influence of micro-organisms and putrefaction in the production of GHB in post-mortem biological fluid. *Forensic Science International* 139, 183-190.
- Eschenbach, D.A., Patton, D.L., Hooton, T.M. *et al.*, 2001. Effects of vaginal intercourse with and without a condom on vaginal flora and vaginal epithelium. *Journal of Infectious Diseases* 183, 913-918.
- Eschenbach, D.A., Thwin, S.S., Patton, D.L. *et al.*, 2000. Influence of the normal menstrual cycle on vaginal tissue, discharge, and microflora. *Clinical Infectious Diseases* 30, 901-907.
- Eschenbach, D.A., Thwin, S.S., Patton, D.L. *et al.*, 2000. Influence of the normal menstrual cycle on vaginal tissue, discharge, and microflora. *Clinical Infectious Diseases* 30, 901-907.
- Fierer, N., Bradford, M.A., Jackson, R.B., 2007. Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology* 88, 1354-1364.
- Fierer, N., Hamady, M., Lauber, C.L. *et al.*, 2008. The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 17994-17999.

- Fierer, N., Lauber, C.L., Zhou, N. *et al.*, 2010. Forensic identification using skin bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 6477-6481.
- Findley, K., Oh, J., Yang, J. *et al.*, 2013. Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin. *Nature* 498, 367-370.
- Flowers, L., Grice, E. A., 2020. The skin microbiota: balancing risk and reward. *Cell host & Microbe* 28, 190-200.
- Franzosa, E.A., Huang, K., Meadow, J.F. *et al.*, 2015. Identifying personal microbiomes using metagenomic codes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, 2930-2938.
- Fredricks, D.N., Fiedler, T.L., Thomas, K.K. *et al.*, 2007. Targeted PCR for detection of vaginal bacteria associated with bacterial vaginosis. *Journal of Clinical Microbiology* 45, 3270-3276.
- Fu, X., Guo, J., Finkelbergs, D. *et al.*, 2019. Fungal succession during mammalian cadaver decomposition and potential forensic implications. *Scientific Reports* 9, 12907.
- Furumiya, J., Nishimura, H., Nakanishi, A. *et al.*, 2011. Postmortem endogenous ethanol production and diffusion from the lung due to aspiration of wood chip dust in the work place. *Legal Medicine* 13, 210-212.
- Giampaoli, S., Berti, A., Valeriani, F. *et al.*, 2012. Molecular identification of vaginal fluid by microbial signature. *Forensic Science International: Genetics* 6, 559-564.
- Gottschalk, G., 1986. Bacterial Fermentations. *Bacterial Metabolism* 2nd, 208-282. Springer Series in Microbiology. Springer.
- Gray, R.H., Kigozi, G., Serwadda, D. *et al.*, 2009. The effects of male circumcision on female partners' genital tract symptoms and vaginal infections in a randomized trial in Rakai, Uganda. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 200, 42.e1-42.e7.
- Grice, E.A., Kong, H.H., Conlan, S. *et al.*, 2009. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science* 324, 1190-1192.
- Guo, J., Fu, X., Liao, H. *et al.*, 2016. Potential use of bacterial community succession for estimating post-mortem interval as revealed by high-throughput sequencing. *Scientific Reports* 6, 24197.
- Hauther, K.A., Cobaugh, K.L., Jantz, L.M. *et al.*, 2015. Estimating time since death from postmortem human gut microbial communities. *Journal of Forensic Sciences* 60, 1234-1240.

- Helander, A., Olsson, I., Dahl, H., 2007. Postcollection synthesis of ethyl glucuronide by bacteria in urine may cause false identification of alcohol consumption. *Clinical Chemistry* 53, 1855-1857.
- Henßge, C., Madea, B., 2004. Estimation of the time since death in the early post-mortem period. *Forensic Science International* 144, 167-175.
- Hillier, S.L., Krohn, M.A., Rabe, L.K. *et al.*, 1993. The normal vaginal flora, H₂O₂-producing lactobacilli, and bacterial vaginosis in pregnant women. *Clinical Infectious Diseases* 16, 273-281.
- Hoffmaster, A.R., Fitzgerald, C.C., Ribot, E. *et al.*, 2002. Molecular subtyping of *Bacillus anthracis* and the 2001 bioterrorism-associated anthrax outbreak, United States. *Emerging Infectious Diseases* 8, 1111-1116.
- Høiseth, G., Karinen, R., Johnsen, L. *et al.*, 2008. Disappearance of ethyl glucuronide during heavy putrefaction. *Forensic Science International* 176, 147-151.
- Hong, E.S., Bang, S.H., Kim, Y.H. *et al.*, 2018. Treatment of livestock carcasses in soil using *Corynebacterium glutamicum* and lysosomal application to livestock burial. *Environmental Health and Toxicology* 33, e2018009.
- Hopkins, D.W., Wiltshire, P.E.J., Turner, B.D., 2000. Microbial characteristics of soils from graves: An investigation at the interface of soil microbiology and forensic science. *Applied Soil Ecology* 14, 283-288.
- Howard, G.T., Norton, W.N., Stroot, P.G. *et al.*, 2012. Association of the genus *Acinetobacter* with the decomposition of a swine carcass and the isolation and characterization of a novel strain of *Acinetobacter* sp. P4. *Current Microbiology* 64, 24-33.
- Huang, S., Haiminen, N., Carrieri, A.P. *et al.*, 2020. Human skin, oral, and gut microbiomes predict chronological age. *mSystems* 5, e00630-19.
- Hyde, E.R., Haarmann, D.P., Lynne, A.M. *et al.*, 2013. The living dead: bacterial community structure of a cadaver at the onset and end of the bloat stage of decomposition. *PloS one* 8, e0191625.
- Choi, A., Shin, K.J., Yang, W.I. *et al.*, 2014. Body fluid identification by integrated analysis of DNA methylation and body fluid-specific microbial DNA. *International Journal of Legal Medicine* 128, 33-41.
- Iglovsky, S., Kriauchiunas, V., 2021. Anthrax cattle burials as a potential threat caused by changes in cryolite zones in the northern European part of Russia. *Health Risk Analysis*.

International commission on radiological protection, 1975. Report of the Task Group on Reference Man. ICRP Publication 23. Pergamon Press, Oxford. <https://www.icrp.org/publication.asp?id=ICRP%20Publication%2023>

Jaffe, H.W., McCurdy, J.M., Kalish, M.L. *et al.*, 1994. Lack of HIV transmission in the practice of a dentist with AIDS. *Annals of Internal Medicine* 121, 855-859.

Jakobs, C., Bojasch, M., Mönch, E. *et al.*, 1981. Urinary excretion of gamma-hydroxybutyric acid in a patient with neurological abnormalities. The probability of a new inborn error of metabolism. *Clinica Chimica Acta* 111, 169-178.

Javan, G.T., Finley, S.J., 2018. What is the “Thanatobiome” and what is its relevance to forensic investigations? *Forensic Ecogenomics* 1st, 133-143. Academic Press.

Jesenská, Z., Bernát, D., 1994. Effect of mycotoxins on in vitro movement of tracheal cilia from one-day-old chicks. *Folia Microbiologica* 39, 155-158.

Johnson, H.R., Trinidad, D.D., Guzman, S. *et al.*, 2016. A machine learning approach for using the postmortem skin microbiome to estimate the postmortem interval. *PloS one* 11, e0167370.

Jones, A.W., P. Holmgren, P., 2003. Comparison of blood-ethanol concentration in deaths attributed to acute alcohol poisoning and chronic alcoholism. *Journal of Forensic Sciences* 48, 874-879.

Jung, J.Y., Yoon, H.K., An, S. *et al.*, 2018. Rapid oral bacteria detection based on real-time PCR for the forensic identification of saliva. *Scientific Reports* 8, 10852.

Kaji, H., Asanuma, Y., Ide, H. *et al.*, 1976. The auto-brewery syndrome: The repeated attacks of alcoholic intoxication due to the overgrowth of *Candida (albicans)* in the gastrointestinal tract. *Materia Medica Polona. Polish Journal of Medicine and Pharmacy* 8, 429-435.

Kaltenpoth, M., Steiger, S., 2014. Unearthing carrion beetles' microbiome: Characterization of bacterial and fungal hindgut communities across the Silphidae. *Molecular Ecology* 23, 1251-1267.

Kavanagh, P.V., Kenny, P., Feely, J., 2010. The urinary excretion of gamma-hydroxybutyric acid in man. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 53, 399-402.

Kawano, S., Tsukamoto, T., Ohtaguro, H. *et al.*, 1995. Sex determination from dental calculus by polymerase chain reaction (PCR). *Japanese Journal of Legal Medicine* 49, 193-198.

Keenan, S.W., Emmons, A.L., Taylor, L.S. *et al.*, 2018. Spatial impacts of a multi-individual grave on microbial and microfaunal communities and soil biogeochemistry. *PloS one* 13, e0208845.

- Keim, P., Budowle, B., Ravel, J., 2011. Microbial forensic investigation of the anthrax-letter attacks. *Microbial Forensics* 2nd, 15-25. Academic Press.
- Keim, P., Kalif, A., Schupp, J. *et al.*, 1997. Molecular evolution and diversity in *Bacillus anthracis* as detected by amplified fragment length polymorphism markers. *Journal of Bacteriology* 179, 818-824.
- Keim, P., Price, L.B., Klevytska, A.M. *et al.*, 2000. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology* 182, 2928-2936.
- Keim, P., Smith, K.L., Keys, C. *et al.*, 2001. Molecular investigation of the Aum Shinrikyo anthrax release in Kameido, Japan. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 4566-4567.
- Kerrigan, S., 2002. In vitro production of gamma-hydroxybutyrate in antemortem urine samples. *Journal of Analytical Toxicology* 26, 571-574.
- Kiessling, A.A., Desmarais, B.M., Yin, H.Z. *et al.*, 2008. Detection and identification of bacterial DNA in semen. *Fertility and Sterility* 90, 1744-1756.
- Kietzerow, J., Otto, B., Wilke, N. *et al.*, 2020. The challenge of post-mortem GHB analysis: storage conditions and specimen types are both important. *International Journal of Legal Medicine* 134, 205-215.
- Kimura, R. 2023. Hidden medical war crimes and the emergence of bioethics in Japan. *Ethical Innovation for Global Health* 1st, 139-148. Springer.
- Klapper, M., Hübner, A., Ibrahim, A. *et al.*, (2023). Natural products from reconstructed bacterial genomes of the Middle and Upper Paleolithic. *Science* 380, 619-624.
- Knight, R., Metcalf, J.L., Gilbert, J.A. *et al.*, 2018. Evaluating the skin microbiome as trace evidence. *National Criminal Justice Reference Service*.
- Kodama, W.A., Xu, Z., Metcalf, J.L. *et al.*, 2019. Trace evidence potential in postmortem skin microbiomes: From death scene to morgue. *Journal of Forensic Sciences* 64, 791-798.
- Kong, H.H., Oh, J., Deming, C. *et al.*, 2012. Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis. *Genome Research* 22, 850-859.
- Koski, A., Ojanperä, I., Vuori, E., 2003. Interaction of alcohol and drugs in fatal poisonings. *Human & Experimental Toxicology* 22, 281-287.

Krasse, B., 1954. The proportional distribution of *Streptococcus salivarius* and other streptococci in various parts of the mouth. *Odontologisk revy* 5, 203-211.

Krous, H.F., Beckwith, J.B., Byard, R.W. *et al.*, 2004. Sudden infant death syndrome and unclassified sudden infant deaths: A definitional and diagnostic approach. *Pediatrics* 114, 234-238

Kruckenber, K.M., DiMartini, A.F., Rymer, J.A. *et al.*, 2020. Urinary auto-brewery syndrome: A case report. *Annals of Internal Medicine* 172, 702-704.

Kumari, P., Prakash, P., Yadav, S. *et al.*, 2022. Microbiome analysis: An emerging forensic investigative tool. *Forensic Science International* 340, 111462.

Kumfao, N., Sukata, S., Phuangphung, P., 2022. The study of postmortem blood gamma-hydroxybutyric acid (GHB) concentrations in Thai dead bodies unrelated to GHB use. *Journal of Associated Medical Sciences* 55, 38-46.

Ladkin, R.G., Davies, J.N.P., 1948. Rupture of stomach in African child. *British Medical Journal* 1, 644.

Lauber, C. L., Hamady, M., Knight, R. *et al.*, 2009. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 5111-5120.

Lax, S., Hampton-Marcell, J.T., Gibbons, S.M. *et al.*, 2015a. Forensic analysis of the microbiome of phones and shoes. *Microbiome* 3, 1-8.

Lax, S., Nagler, C.R., Gilbert, J.A., 2015b. Our interface with the built environment: Immunity and the indoor microbiota. *Trends in Immunology* 36, 121-123.

Lax, S., Smith, D.P., Hampton-Marcell, J. *et al.*, 2014. Longitudinal analysis of microbial interaction between humans and the indoor environment. *Science* 345, 1048-1052.

LeBeau, M.A., Miller, M.L., Levine B., 2000. Effect of storage temperature on endogenous GHB levels in urine. *Forensic Science International* 119, 161-167.

Lederberg, J., McCray, A.T., 2001. „Ome Sweet Omics“ A genealogical treasury of words. *The Scientist* 15, 8.

van Leeuwenhoek, A., 1683. Letter from Antoni van Leeuwenhoek to Francis Aston, dated at Delft, 17 September 1683. EL/L1/69. The Royal Society Archives, London. https://makingscience.royalsociety.org/items/el_11_69/letter-from-antoni-van-leeuwenhoek-to-francis-aston-dated-at-delft?page=1

- Liskova, E.A., Egorova, I.Y., Selyaninov, Y.O. *et al.*, 2021. Reindeer anthrax in the Russian Arctic, 2016: Climatic determinants of the outbreak and vaccination effectiveness. *Frontiers in Veterinary Science* 8, 668420.
- Liu, C.M., Hungate, B.A., Tobian, A.A. *et al.*, 2013. Male circumcision significantly reduces prevalence and load of genital anaerobic bacteria. *mBio* 4, e00076.
- Liu, C.M., Hungate, B.A., Tobian, A.A. *et al.*, 2015. Penile microbiota and female partner bacterial vaginosis in Rakai, Uganda. *mBio* 6, e00589.
- Lloyd, J., 2002. Fact Sheet: Gamma Hydroxybutyrate (GHB). ONDCP, Drug Policy Information Clearinghouse. <https://www.ojp.gov/ncjrs/virtual-library/abstracts/gamma-hydroxybutyrate-ghb-fact-sheet>
- Lundquist, O., Osterlin, S., 1994. Glucose concentration in the vitreous of nondiabetic and diabetic human eyes. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 32, 71-74.
- Lyman, S.A., Hughes-McLain, C., Thompson G., 1998. "Date-Rape Drugs": A Growing Concern. *Journal of Health Education* 29, 271-277.
- Maile, A.E., Inoue, C.G., Barksdale, L.E. *et al.*, 2017. Toward a universal equation to estimate postmortem interval. *Forensic Science International* 272, 150-153.
- Manchee, R.J., Broster, M.G., Melling, J. *et al.*, 1981. *Bacillus anthracis* on Gruinard Island. *Nature* 294, 254-255.
- Mann, A.E., Sabin, S., Ziesemer, K. *et al.*, 2018. Differential preservation of endogenous human and microbial DNA in dental calculus and dentin. *Scientific Reports* 8, 9822.
- Marchesi, J.R., Ravel, J., 2015. The vocabulary of microbiome research: A proposal. *Microbiome* 3, 31.
- Marinetti, L.J., 2001. γ -Hydroxybutyric acid and its analogs, γ -butyrolactone and 1,4-butanediol, benzodiazepines and GHB 1st, 95-126. *Forensic Science and Medicine*. Humana Press.
- Marples, M.J., 1969. Life on the human skin. *Scientific American* 220, 108-115.
- Martin, I.M.C., Foreman, E., Hall, V. *et al.*, 2007. Non-cultural detection and molecular genotyping of *Neisseria gonorrhoeae* from a piece of clothing. *Journal of Medical Microbiology* 56, 487-490.
- Mayes, R., Levine, B., Smith, M.L. *et al.*, 1992. Toxicologic findings in the USS Iowa disaster. *Journal of Forensic Sciences* 37, 1352-1357.

- Meadow, J.F., Altrichter, A.E., Green, J.L., 2014. Mobile phones carry the personal microbiome of their owners. *PeerJ* 2, e447.
- Meselson, M., Guillemin, J., Hugh-Jones, M. *et al.*, 1994. The Sverdlovsk anthrax outbreak of 1979. *Science* 266, 1202-1208.
- Metcalf, J.L., Wegener Parfrey, L., Gonzalez, A. *et al.*, 2013. A microbial clock provides an accurate estimate of the postmortem interval in a mouse model system. *eLife* 2, e01104.
- Metcalf, J.L., Xu, Z.Z., Weiss, S. *et al.*, 2016. Microbial community assembly and metabolic function during mammalian corpse decomposition. *Science* 351, 158-162.
- Metzker, M.L., Mindell, D.P., Liu, X.M. *et al.*, 2002. Molecular evidence of HIV-1 transmission in a criminal case. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 14292-14297.
- Meyer, J., Anderson, B., Carter, D.O., 2013. Seasonal variation of carcass decomposition and gravesoil chemistry in a cold (Dfa) climate. *Journal of Forensic Sciences* 58, 1175-1182.
- Mlejnková, H., Očenášková, V., Sovová, K. *et al.*, 2020. Coronavirus SARS-CoV-2 in surface and wastewater. *Water Management Technical and Economical Information Journal* 62, 28-32.
- Molony, N., Blackwell, C.C., Busuttil, A., 1999. The effect of prone posture on nasal temperature in children in relation to induction of staphylococcal toxins implicated in sudden infant death syndrome. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 25, 109-113.
- Molony, N.C., Kerr, A.I., Blackwell, C.C. *et al.*, 1996. Is the nasopharynx warmer in children than in adults? *Journal of Clinical Forensic Medicine* 3, 157-160.
- Moriya, F., Hashimoto, Y., 2004. Endogenous gamma-hydroxybutyric acid levels in postmortem blood. *Legal Medicine* 6, 47-5.
- Mudge, S.M., Ball, A.S., 2005. Sewage. *Environmental forensics: Contaminant specific guide* 1st, 35-53. Academic Press.
- Nakanishi, H., Ohmori, T., Hara, M. *et al.*, 2011. A simple identification method of saliva by detecting *Streptococcus salivarius* using loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Forensic Sciences* 56, 158-161.
- Nelson, E.L., 2000. Estimation of short-term postmortem interval utilizing core body temperature: A new algorithm. *Forensic Science International* 109, 31-38.

- NIH HMP Working Group, Peterson, J., Garges, S. *et al.*, 2009. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Research* 19, 2317-2323.
- Nishimura, H., Moriya, F., Hashimoto, Y., 2009. Mechanisms of γ -hydroxybutyric acid production during the early postmortem period. *Forensic Toxicology* 27, 55-60.
- Noyes, N., Cho, K.C., Ravel, J. *et al.*, 2018. Associations between sexual habits, menstrual hygiene practices, demographics and the vaginal microbiome as revealed by Bayesian network analysis. *PLoS ONE* 13, e0191625
- Nye, N., 2020. ‘The sexome’: Identifying unique microbial signatures in male and female pairings, 66-78.
- Oakley, B.B., Fiedler, T.L., Marrazzo, J.M. *et al.*, 2008. Diversity of human vaginal bacterial communities and associations with clinically defined bacterial vaginosis. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 4898-4909.
- Oh, J., Byrd, A.L., Deming, C. *et al.*, 2014. Biogeography and individuality shape function in the human skin metagenome. *Nature* 514, 59-64.
- Oh, J., Byrd, A.L., Park, M. *et al.*, 2016. Temporal stability of the human skin microbiome. *Cell* 165, 854-866.
- Olsen, T., Hearn, W.L., 2003. Stability of ethanol in postmortem blood and vitreous humor in long-term refrigerated storage. *Journal of Analytical Toxicology* 27, 517-519.
- Ou, C.Y., Ciesielski, C.A., Myers, G. *et al.*, 1992. Molecular epidemiology of HIV transmission in a dental practice. *Science*, 256, 1165-1171.
- Parmenter, R.R., MacMahon, J.A., 2009. Carrion decomposition and nutrient cycling in a semiarid shrub–steppe ecosystem. *Ecological Monographs* 79, 637-661.
- Payne, J.A., 1965. A summer carrion study on the baby pig *Sus scrofa* Linnaeus. *Ecology* 46, 595-602.
- Pearce, J.L., Bettelheim, K.A., Luke, R.K. *et al.*, 2010. Serotypes of *Escherichia coli* in sudden infant death syndrome. *Journal of Applied Microbiology* 108, 731-735.
- Pechal, J.L., Crippen, T.L., Benbow, M.E. *et al.*, 2014. The potential use of bacterial community succession in forensics as described by high throughput metagenomic sequencing. *International Journal of Legal Medicine* 128, 193-205.

- Pechal, J.L., Schmidt, C.J., Jordan, H.R. *et al.*, 2018. A large-scale survey of the postmortem human microbiome, and its potential to provide insight into the living health condition. *Scientific Reports* 8, 5724.
- Price, L.B., Liu, C.M., Johnson, K.E. *et al.*, 2010. The effects of circumcision on the penis microbiome. *PLoS One* 5, e8422.
- Purahong, W., Wubet, T., Lentendu, G. *et al.*, 2016. Life in leaf litter: Novel insights into community dynamics of bacteria and fungi during litter decomposition. *Molecular Ecology* 25, 4059-4074.
- R v Clark, 11.4. 2003. [2003] EWCA Crim 1020. England and Wales Court of Appeal (Criminal Division). <https://www.casemine.com/judgement/uk/5a8ff7b160d03e7f57eb1460>
- Ravel, J., Gajer, P., Abdo, Z. *et al.*, 2011. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 4680-4687.
- Ravel, J., Jiang, L., Stanley, S.T. *et al.*, 2009. The complete genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames "Ancestor". *Journal of Bacteriology* 191, 445-446.
- Read, T.D., Salzberg, S.L., Pop, M. *et al.*, 2002. Comparative genome sequencing for discovery of novel polymorphisms in *Bacillus anthracis*. *Science* 296, 2028-2033.
- Revich, B.A., Podolnaya, M.A., 2011. Thawing of permafrost may disturb historic cattle burial grounds in East Siberia. *Global Health Action* 4.
- Saukko, P., Knight, B., 2004. The pathophysiology of death, Deaths associated with sexual offences, Sudden death in infancy. *Knight's Forensic Pathology* 3rd edition, 52-89, 421-423, 455. CRC press.
- Sender, R., Fuchs, S., Milo, R., 2016. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS biology* 14, e1002533.
- Shadomy, S., ElIdrissi, A., Raizman, E. *et al.*, 2016. Anthrax outbreaks: A warning for heightened awareness. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://www.fao.org/documents/card/en/c/bdce4fbb-8f8b-401e-96a5-86a5338a678a/>
- Schmedes, S.E., Sajantila, A., Budowle, B., 2016. Expansion of microbial forensics. *Journal of Clinical Microbiology* 54, 1964-1974.
- Schwebke, J.R., Richey, C.M., Weiss, H.L., 1999. Correlation of behaviors with microbiological changes in vaginal flora. *The Journal of Infectious Diseases* 180, 1632-1636.

Smędra, A., Trzmielak, M., Góralaska, K. *et al.*, 2022. Oral form of auto-brewery syndrome. *Journal of Forensic and Legal Medicine* 87, 102333.

Smithson A.E., 2000. Rethinking the lessons of Tokyo Stimson Center report No. 35. Ataxia: The Chemical and Biological Terrorism Threat and the US Response 1st, 71-111. Henry L. Stimson Center.

Sommers, L.E., Gilmour, C.M., Wildung, R.E. *et al.*, 1981. The effect of water potential on decomposition processes in soils. *Water Potential Relations in Soil Microbiology*, 97-117. SSSA Special Publication.

Song, S.J., Lauber, C., Costello, E.K. *et al.*, 2013. Cohabiting family members share microbiota with one another and with their dogs. *eLife* 2, e00458.

Spade, K.M., 2013. Of dirt and decomposition: Proposing a place for the urban dead.

Srinivasan, S., Hoffman, N.G., Morgan, M.T. *et al.*, 2012. Bacterial communities in women with bacterial vaginosis: High resolution phylogenetic analyses reveal relationships of microbiota to clinical criteria. *PLoS One* 7, e37818.

Stark, J.M., Firestone, M.K., 1995. Mechanisms for soil moisture effects on activity of nitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 218-221.

Sylvester, P.A., Wong, N.A., Warren, B.F. *et al.*, 1998. Unacceptably high site variability in postmortem blood alcohol analysis. *Journal of Clinical Pathology* 51, 250-252.

Štoček, J., Bechyňková, L., 2023. Roznašeč HIV. Vrah je v každém z nás 2. Svazek 2, 110-135. Albatros Media a.s.

Takahashi, H., Keim, P., Kaufmann, A.F. *et al.*, 2004. *Bacillus anthracis* incident, Kameido, Tokyo, 1993, *Emerging Infectious Diseases* 10, 117-120.

Tarone, A.M., Foran, D.R., 2011. Gene expression during blow fly development: Improving the precision of age estimates in forensic entomology. *Journal of Forensic Sciences* 56, 112-122.

Towne, E.G., 2000. Prairie vegetation and soil nutrient responses to ungulate carcasses. *Oecologia* 122, 232-239.

Traeger, M.S., Wiersma, S.T., Rosenstein, N.E., 2002. First case of bioterrorism-related inhalational anthrax in the United States, Palm Beach County, Florida. *Emerging Infectious Diseases* 8, 1029-1034

Tridico, S.R., Murray, D.C., Addison, J. *et al.*, 2014. Metagenomic analyses of bacteria on human hairs: A qualitative assessment for applications in forensic science. *Investigative Genetics* 5, 16.

Tsutsumi, H., Higashide, K., Mizuno, Y. *et al.*, 1991. Identification of saliva stains by determination of the specific activity of amylase. *Forensic Science International* 50, 37-42.

USS Iowa investigation team, 28. 8. 1991. USS Iowa explosion, Sandia National Laboratories' final technical report. <https://www.gao.gov/assets/nsiad-91-4s.pdf>

Vass, A.A., Bass, W.M., Wolt, J.D. *et al.*, 1992. Time since death determinations of human cadavers using soil solution. *Journal of Forensic Sciences* 37, 1236-1253.

Vogel, H., Shukla, S.P., Engl, T. *et al.*, 2017. The digestive and defensive basis of carcass utilization by the burying beetle and its microbiota. *Nature Communications* 8, 15186.

Walsh, M.G., de Smalen, A.W., Mor, S.M., 2018. Climatic influence on anthrax suitability in warming northern latitudes. *Scientific Reports* 8, 9269.

Ward, N.L., Challacombe, J.F., Janssen, P.H. *et al.*, 2009. Three genomes from the phylum *Acidobacteria* provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 2046-2056.

Warinner, C., Rodrigues, J. F., Vyas, R. *et al.*, 2014. Pathogens and host immunity in the ancient human oral cavity. *Nature Genetics* 46, 336-344.

White, D.J., 1991. Processes contributing to the formation of dental calculus. *Biofouling* 4, 209-218.

WHO Guidelines on hand hygiene in health care: First global patient safety challenge clean care is safer care, 2009. Geneva: World Health Organization. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241597906>

Wilkins, D., Leung, M.H., Lee, P.K., 2017. Microbiota fingerprints lose individually identifying features over time. *Microbiome* 5, 1.

Williams, D.W., Gibson, G., 2017. Individualization of pubic hair bacterial communities and the effects of storage time and temperature. *Forensic Science International: Genetics* 26, 12-20.

Williams, D.W., Gibson, G., 2019. Classification of individuals and the potential to detect sexual contact using the microbiome of the pubic region. *Forensic Science International: Genetics* 41, 177-187.

Willinger, M., James, L.S., Catz, C., 1991. Defining the sudden infant death syndrome (SIDS): Deliberations of an expert panel convened by the National Institute of Child Health and Human Development. *Pediatric Pathology* 11, 677-684.

- Willott G.M., 1974. An improved test for the detection of salivary amylase in stains. *Journal of the Forensic Science Society* 14, 341-344.
- Workowski, K.A., Bachmann, L.H., Chan, P.A. *et al.*, 2021. Sexually transmitted infections treatment guidelines. Recommendations and reports: Morbidity and Mortality Weekly Report 70, 1-187.
- Worsham, P.L., Sowers, M.R., 1999. Isolation of an asporogenic (spoOA) protective antigen-producing strain of *Bacillus anthracis*. *Canadian Journal of Microbiology* 45, 1-8.
- Xiao, F., Tang, M., Zheng, X. *et al.*, 2020. Evidence for gastrointestinal infection of SARS-CoV-2. *Gastroenterology* 158, 1831-1833.e3.
- Yeatman, D.T., Reid, K., 2003. A study of urinary endogenous gamma-hydroxybutyrate (GHB) levels. *Journal of Analytical Toxicology* 27, 40-42.
- Zhu, N., Zhang, D., Wang, W. *et al.*, 2020. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine* 382, 727-733.
- Zorgani, A., Essery, S.D., Madani, O.A. *et al.*, 1999. Detection of pyrogenic toxins of *Staphylococcus aureus* in sudden infant death syndrome. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 25, 103-108.
- Zozaya, M., Ferris, M.J., Siren, J.D. *et al.*, 2016. Bacterial communities in penile skin, male urethra, and vaginas of heterosexual couples with and without bacterial vaginosis. *Microbiome* 4, 16.
- Zumwalt, R.E., Bost, R.O., Sunshine, I., 1982. Evaluation of ethanol concentrations in decomposed bodies. *Journal of Forensic Sciences* 27, 549-554.