

Forenzička mikrobiologija

Bušić, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:598530>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-27**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine
Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Iva Bušić

Forenzička mikrobiologija

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Katedri za medicinsku mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb – Rebro, Klinički zavod za kliničku i molekularnu mikrobiologiju, pod vodstvom prof. dr. sc. Ane Budimir i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2021./2022.

SADRŽAJ

Sažetak

Summary

1. Uvod.....	1
1.1. Forenzika i forenzička mikrobiologija.....	1
1.2. Povijest forenzičke mikrobiologije.....	2
2. Primjena forenzičke mikrobiologije.....	4
2.1. Bioterorizam.....	4
2.1.1. Forenzička mikrobiologija u ostalim kaznenim djelima.....	6
2.2. Postmortem analize.....	7
2.2.1. Utvrđivanje uzroka smrti.....	8
2.3. Istraživanje prijenosa infektivnih uzročnika.....	11
3. Tehnike koje se koriste u forenzičkoj mikrobiologiji.....	12
3.1. Tradicionalne i suvremene metode.....	12
3.1.1. Genotipizacija.....	12
3.1.2. Ostale molekularne metode.....	14
3.2. Forenzički relevantni mikroorganizmi.....	15
3.2.1. Bakterije.....	15
3.2.2. Ostali mikroorganizmi.....	17
3.3. Obdukcijaska mikrobiologija.....	17
4. Postmortalna translokacija mikroorganizama.....	19
5. Zaključak.....	20
6. Zahvale.....	22

7. Literatura.....	23
8. Životopis.....	38

Sažetak

Forenzička mikrobiologija

Iva Bušić

Forenzička mikrobiologija spada u novije grane forenzike, a bavi se utvrđivanjem mikroorganizama i njihovih toksina, te povezivanjem istih s određenom osobom ili skupinom u kazneno-pravnim slučajevima. To su prvenstveno biološki zločini i bioterorizam, ali i mnogi drugi slučajevi, poput seksualnog napada, liječničke pogreške ili nehotičnog širenja zaraze. Uslijed pojave sve preciznijih metoda analize mikroorganizama, forenzička mikrobiologija u suvremenom smislu počinje djelovati od 1990-ih godina. Svijest o važnosti ovog područja podiže se nakon bioterorističkog napada sporama bakterije *Bacillus anthracis* u Sjedinjenim Američkim Državama. Forenzička mikrobiologija ima velik značaj u postmortalnim analizama, primjerice u utvrđivanju uzroka smrti ili utvrđivanju vremena smrti, odnosno postmortalnog intervala (*engl. post-mortem interval*, PMI) pri obdukciji. Za identifikaciju mikroorganizama, u forenzičkoj mikrobiologiji koriste se iste metode i tehnologije kao i u istraživačkoj i dijagnostičkoj mikrobiologiji. Molekularne tehnike sekvenciranja i genotipizacije, zbog iznimne sposobnosti razlikovanja mikroorganizama na temelju varijacija u njihovom genomu, danas su neophodne. Budući da navedene metode postaju sve dostupnije i preciznije, očekuje se unaprjeđenje područja forenzičke mikrobiologije. Iako javnost često doživljava forenzičku znanost kao nepogrešiv alat za rješavanje kazneno-pravnih slučajeva, valja znati da je forenzička mikrobiologija još uvijek u početnim fazama razvoja i da nailazi na brojna ograničenja. Činjenica je, međutim, da ovo područje ima velik potencijal za daljnji razvoj i primjenu.

Ključne riječi:

bioterorizam, forenzika, genotipizacija, mikrobiologija, obdukcija

Summary

Forensic microbiology

Iva Bušić

Forensic microbiology is one of the newer branches of forensics, which deals with the identification of microorganisms and their toxins, and links them to a specific person or group in criminal cases, primarily in biological crimes and bioterrorism. However, it is crucial in many other cases, such as sexual assault, medical error or inadvertent transmission of infectious disease. The emergence of more precise methods of microorganism analysis marked the beginning of modern forensic microbiology in the 1990s. Awareness of the importance of this discipline has been raised after the terrorist attack with the *Bacillus anthracis* spores in the United States. Forensic microbiology is important in postmortem analyses, for instance in determining the cause of death or time of death (post-mortem interval, PMI) at autopsy. For microorganism identification, the methods and technologies used in forensic microbiology are the same as in research and diagnostic microbiology. Molecular sequencing and genotyping techniques are nowadays a diagnostic standard, due to their exceptional ability to differentiate microorganisms based on genome variations. As these methods become more accessible and accurate, further advances in the field of forensic microbiology are expected. Although the public often perceives forensic science as an infallible tool for resolving legal cases, it should be noted that forensic microbiology is still in the early stages of development and faces a number of limitations. Nevertheless, this field has great potential for further improvement and application.

Keywords:

autopsy, bioterrorism, forensics, genotyping, microbiology

POPIS I OBJAŠNJENJE KRATICA

CDC – Američki centri za kontrolu i prevenciju bolesti (*engl. Centers for Disease Control and Prevention*)

cm – centimetar

CSI – Očevid, kratica naziva televizijske serije (*engl. Crime Scene Investigation*)

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (*engl. deoxyribonucleic acid*)

ECL – elektrokemiluminiscencija (*engl. electrochemiluminescence*)

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina (*engl. ethylenediaminetetraacetic acid*)

ESCMID – Europsko društvo za mikrobiologiju i zarazne bolesti (*engl. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*)

ESGFOR – Istraživačka skupina za forenziku i postmortalnu mikrobiologiju (*engl. ESCMID Study Group of Forensic and Post-mortem Microbiology*)

ESP – Europsko društvo za patologiju (*engl. European Society of Pathology*)

FBI – Američki savezni istražni ured (*engl. Federal Bureau of Investigation*)

HCV – virus hepatitisa C (*engl. hepatitis C virus*)

HIV – virus humane imunodeficijencije (*engl. human immunodeficiency viruses*)

HMRU – Jedinica za opasne materijale (*engl. Hazardous Materials Response Unit*)

MALDI-TOF – laserska tehnika ionizacije u masenoj spektrometriji (*engl. matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight*)

MLVA – multilokusna analiza tandemskih ponavljanja promjenjivog broja (*engl. multiple locus variable-number tandem repeat analysis*)

MPS – masivno paralelno sekvenciranje (*engl. massively parallel sequencing*)

NCBI – Nacionalni centar za biotehnološke informacije (*engl. National Center for Biotechnology Information*)

NGS – sekvenciranje nove generacije (*engl. next-generation sequencing*)

PCR – polimerazna lančana reakcija (*engl. polymerase chain reaction*)

PMI – postmortalni interval (*engl. post-mortem interval*)

qPCR – kvantitativna polimerazna lančana reakcija (*engl. quantitative polymerase chain reaction*)

RFLP – polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata (*engl. restriction fragment length polymorphism*)

RNA – ribonukleinska kiselina (*engl. ribonucleic acid*)

SARS – teški akutni respiratorni sindrom (*engl. severe acute respiratory syndrome*)

SIDS – sindrom iznenadne dojenačke smrti (*engl. sudden infant death syndrome*)

SMS – sekvenciranje jedne molekule (*engl. single molecule sequencing*)

SNP – polimorfizam jednog nukleotida (*engl. single nucleotide polymorphisms*)

spp. – vrste, unutar roda (*lat. species*)

STR – kratka tandemska ponavljanja (*engl. short tandem repeats*)

SUDI – sindrom iznenadne i neočekivane smrti malog djeteta (*engl. sudden unexpected death in infancy*)

VNTR – tandemska ponavljanja promjenjivog broja (*engl. variable number tandem repeat*)

WGS – sekvenciranje cijelog genoma (*engl. whole genome sequencing*)

1. Uvod

1.1. Forenzika i forenzička mikrobiologija

Forenzika je znanstvena disciplina koja nastoji primjenom biokemijskih i/ili drugih znanstvenih metoda utvrditi uzrok smrti ili pronaći osobu ili skupinu koja je počinila zločin (Lehman, 2012; Blondeau i sur., 2019). Iako je zbog opsežnosti teško navesti sva područja koja forenzika proučava ili s kojima surađuje, može se podijeliti na 4 velike skupine. To su uviđaj na terenu i prikupljanje dokaza, digitalna forenzika, laboratorijska forenzika (uključuje, primjerice, kemiju, biologiju i toksikologiju), te sudska medicina (uključuje, primjerice patologiju, psihijatriju i sudskomedicinsku obdukciju). Forenzička mikrobiologija uvjetno se može svrstati u posljednju skupinu. (Lehman, 2012; Carter i sur., 2017; United States Department of Justice, 2021; Australia New Zealand Policing Advisory Agency, 2022).

Forenzička mikrobiologija je znanstvena disciplina koja se bavi proučavanjem dokaza, utvrđivanjem i povezivanjem mikroorganizama i njihovih toksina s osobom ili skupinom odgovornom za bioteroristički čin, biološki zločin ili nehotično širenje zaraze (Budowle i sur. 2003; National Research Council, 2014; Lehman, 2012). Forenzička mikrobiologija nastoji brzo dati pouzdane informacije na temelju kojih je moguće izvesti zaključke koji će pomoći u provođenju zakona te zaštititi javno zdravlje. Zbog toga je često neophodna suradnja sa znanstvenicima iz područja genetike, agronomije, ostalih grana mikrobiologije, epidemiologije i drugih područja (NRC, 2014; Carter i sur., 2017). Iako je forenzička mikrobiologija u mnogome slična molekularnoj epidemiologiji, koja se bavi praćenjem izbijanja zaraznih bolesti, razlikuju se u namjeni. Naime, forenzička mikrobiologija treba dati dokaze i proizvesti zaključke koji moraju biti dovoljno snažni, ne samo za znanstvenu zajednicu i javnost, već i za pravosuđe (Carter i sur., 2017). Nadalje, prioriteti forenzičke mikrobiologije razlikuju se od onih u znanstveno-istraživačkoj ili dijagnostičkoj mikrobiologiji, no postupanje s uzorkom i metode identifikacije mikroorganizama su jednake (Blondeau i sur., 2019). Forenzička mikrobiologija relativno je novo znanstveno područje, koje se intenzivnije počelo razvijati od 2001. godine, kao odgovor na bioteroristički napad antraksom u Sjedinjenim Američkim Državama (Lehman, 2012; Carter i sur., 2017). Osim što koristi klasične metode, kao što su mikrobiološka kultura i biokemijski

testovi, ovo područje znatno je unaprijeđeno novijim tehnologijama – metodama molekularne biologije, genetike i filogenetike (Lehman, 2012; Carter i sur., 2017). Upravo je genotipizacija mikroorganizama posljednjih godina zaslužna za pouzdanost i jednoznačnost zaključaka u najvećem broju istraživanih slučajeva (Lehman, 2012; Carter i sur., 2017; Robinson i sur., 2021).

1.2. Povijest forenzičke mikrobiologije

Suvremena forenzička mikrobiologija utemeljena je 1990-ih u Sjedinjenim Američkim Državama, osnivanjem Jedinice za opasne materijale (*engl. Hazardous Materials Response Unit*, HMRU), u sklopu Saveznog istražnog ureda (*engl. Federal Bureau of Investigation*, FBI). HMRU je osnovan za istraživanje sumnjivih ili poznatih slučajeva bioterorizma. Iako je prvotni prioritet bio korištenje znanstvenih metoda kako bi se zadovoljili sudsko-pravni zahtjevi, FBI je 1996. ostvario suradnju s američkom javnozdravstvenim službama – Centrima za kontrolu bolesti i prevenciju (*engl. Centers for Disease Control and Prevention*, CDC) koja još traje (NRC, 2014). Osim toga, 1990–1992. godine, filogenetska analiza mikroorganizama u forenzici po prvi put je predstavljena široj javnosti kroz slučaj navodnog prijenosa virusa humane imunodeficijencije (*engl. human immunodeficiency virus*, HIV) sa zaraženog stomatologa iz Floride na njegove pacijente tijekom stomatoloških zahvata (Smith i Waterman, 1992.; Robinson i sur., 2021; Bernard i sur., 2007; Schmedes i sur., 2016). Filogenetskom analizom razriješen je i slučaj gastroenterologa koji je 1994. namjerno svojoj djevojci ubrizgao miješani uzorak krvi koji je sadržavao viruse HIV-a i virus hepatitisa C (HCV) (Schmedes i sur., 2016). Značajan je i slučaj španjolskog anesteziologa, koji je zarazio 275 pacijenata virusom hepatitisa C, a što je naknadno potvrđeno filogenetskom rekonstrukcijom (Schmedes i sur., 2016). Valja spomenuti slučaj praćenja i utvrđivanja sličnosti sojeva bakterije *Staphylococcus aureus* 2000.-2001. godine, nađenima na inhalacijskim pomagalicama za uzimanje droga, čime je bilo moguće popratiti mrežu korisnika opojnih droga (Schmedes i sur., 2016). Forenzička mikrobiologija doživjela je najveće promjene i stekla globalno priznanje nakon slučaja *Amerithrax*, bioterorističkog napada koji se dogodio 2001. godine u Sjedinjenim Američkim Državama. Radilo se o pošiljkama koje su sadržavale spore

bakterije *Bacillus anthracis* (Federal Bureau of Investigation, 2010; Blondeau i sur., 2019; Schmedes i sur., 2016).

Još jedan poznati slučaj zaraze sporama *Bacillus anthracis*, nepovezan s *Amerithraxom*, dogodio se 2009. u Škotskoj, gdje se antraks pojavio među koristicima heroína (Schmedes i sur., 2016).

Kako forenzička mikrobiologija ne obuhvaća samo istraživanje zločina, već se isprepliće s istraživačkom mikrobiologijom te epidemiologijom, valja spomenuti i neke slučajeve nepovezane s kriminalnim radnjama, u kojima je forenzička mikrobiologija imala bitnu ulogu (Schmedes i sur., 2016). To su, primjerice, istraživanje izvora epidemije kolere 2010. na Haitiju, izvora epidemije soja O104:H4 bakterije *Escherichia coli* u Njemačkoj 2011., istraživanje izvora i prijenosa virusa ebole 2014. godine ili identificiranje posmrtnih ostataka koji vjerojatno potječu iz Drugog svjetskog rata pomoću analize parvovirusa B19 (Schmedes i sur., 2016).

2. Primjena forenzičke mikrobiologije

2.1. Bioterorizam i biološki zločin

Pojam bioterorizam podrazumijeva zločin u kojem pojedinac ili skupina prijeti ili se koristi štetnim biološkim agensom u svrhu postizanja političkih, vjerskih, ekoloških ili drugih ideoloških ciljeva (NRC, 2014; Jansen i sur., 2014). Međutim, proučavajući brojne slučajeve u kojima su korišteni štetni biološki agensi, zaključeno je da se u većini slučajeva radilo ipak o „tradicionalnim“ zločinačkim motivima, kao što su iznuda, osveta, uznemiravanje ili ubojstvo. Zbog toga, treba razdvojiti te, ostale biološke zločine, od onih ideološki potaknutih (NRC, 2014). Dakle, i u bioterorizmu i u biološkom zločinu kao oružje koristi se štetni biološki agens koji može narušiti zdravlje pojedinca ili skupine, ali razlikuju se u krajnjem cilju (Jansen i sur., 2014). Štetni biološki agens, odnosno biološko oružje, prema američkom Nacionalnom centru za biotehnoške informacije (NCBI) može biti sam mikroorganizam ili toksin kojega proizvodi mikroorganizam ili neki drugi organizam (Carter i sur., 2017; Jansen i sur., 2014). Općenito, za stvaranje biološkog oružja potrebno je malo ili nimalo poznavanja mikrobiologije. Uglavnom ne zahtijeva veliki prostor ili resurse. Osim toga, za uznemiravanje javnosti ne trebaju ni velike količine uzročnika, već je dovoljno tek nekoliko slučajeva zaraze. (Henderson, 1999). Biološki zločini mogu ugrožavati neposredno pojedince i skupine ljudi, ili posredno, oštećujući poljoprivredu i vodoopskrbu (agrotorizam) (Carter i sur., 2017). Postoji velik broj patogena i njihovih produkata koji bi se mogli iskoristiti kao biološko oružje. Američki CDC je stoga sastavio popis uzročnika i toksina koji imaju potencijal za pokretanje bioloških zločina. Mnogi od tih uzročnika neuobičajeni su izolati u laboratorijima kliničke mikrobiologije, dok oni uobičajeni uzročnici trebaju pobuditi sumnju tek ako zaraza poraste iznad endemskih razina (CDC, 2022; American Society for Microbiology, 2022; Lehman, 2012).

Prvi biološki zločin koji je dokazan pomoću molekularnih metoda već spomenuti je slučaj iz 1994. kada je gastroenterolog iz Louisiane svojoj djevojci namjerno ubrizgao miješani uzorak krvi koji je sadržavao viruse HIV-a i hepatitisa C, dok je njoj rekao da joj daje vitamin B. Godine 1995. žrtva je bila pozitivna na HIV, iako je bila HIV negativna do 1994. godine, čime je pokrenuta istraga. Svi prethodni seksualni partneri žrtve pokazali su se HIV-negativnima na testiranju. K tome, nije bio

evidentiran nijedan incident koji je mogao dovesti do zaraze. No, kako je dokumentacija koju je vodio gastroenterolog ukazivala da je vadio krv HIV-pozitivnoj osobi 1994., istražitelji su zatražili krv te osobe, žrtve i uzorke krvi drugih HIV-pozitivnih osoba na tom području u svrhu filogenetske analize virusa. Pokazalo se da su sojevi HIV-pozitivne osobe i žrtve bili dovoljno slični da se zaključi povezanost, te da liječnik bude optužen za pokušaj ubojstva (Metzker i sur., 2002.; Carter i sur., 2017). Za forenzičku mikrobiologiju vrlo značajan bioteroristički napad, *Amerithrax*, dogodio se u Sjedinjenim Američkim Državama 2001. godine. Tada nepoznata osoba putem pošte slala je pisma dvojici senatora i nekim medijskim kućama. Pisma su sadržavala spore bakterije *B. anthracis*, koje uzrokuju bolest antraks (Higgins i sur., 2003; Lehman, 2012; FBI, 2010; Carter i sur., 2017). U tom napadu zaražene su 22 osobe, od kojih je 11 osoba razvilo inhalacijski oblik antraksa, a 5 i umrlo od posljedica bolesti. Ostalih 11 razvilo je kožni oblik antraksa. Uzorci patogena obrađeni su pomoću multilokusne analize varijabilnog broja tandemskih ponavljanja (*engl. Multilocus Variable-Number Tandem Repeat Analysis*, MLVA) (Keim i sur., 2000; Lehman, 2012) i metodom polimorfizama jednog nukleotida (*engl. single nucleotide polymorphism*, SNP) (Carter i sur., 2017), te najzad sekvenciranje cijelog genoma (*engl. whole genome sequencing*, WGS) (NRC, 2014) poznatih laboratorijskih sojeva, što je identificiralo laboratorijski soj Ames bakterije *Bacillus anthracis* (Higgins i sur., 2003; Van Ert i sur., 2007; Lehman, 2012). Nakon tog otkrića, iako FBI time nije mogao precizno odrediti točan izvorni laboratorij, kombinacijom ostalih čimbenika, osumnjičen je laboratorijski radnik, dr. B. Ivins (Carter i sur., 2017; FBI, 2010). Osim što je ovaj slučaj doveo do veće osviještenosti o biološkim zločinima, bitan je i sa znanstvenog stajališta. Prije *Amerithraxa*, forenzička mikrobiologija oslanjala se na metode genotipizacije mikroorganizama temeljene tek na dijelu genomskih sekvenci. Međutim, u ovoj istrazi primijenjen je WGS te je uključena komparativna genomika u svrhu utvrđivanja ključnih značajki genoma soja Ames bakterije *B. anthracis* (Rasko i sur., 2011). Radi zaštite od bioterorističkih ili drugih mikrobioloških prijetnji, kao što su epidemije, neki autori ističu važnost razvijanja biosenzora i drugih mehanizama bionadzora (Blondeau i sur., 2019; NRC, 2014; Bokhari, 2018). Također, poznato je nekoliko drugih slučajeva zaraze HIV-om putem seksualnog kontakta, a gdje je krivnja dokazana upravo filogenetskom analizom (Lehman, 2012; Huber i Crawford, 2009). Zanimljiv slučaj koji pokazuje sinergiju znanosti i prava je slučaj HIV pozitivnog

muškarca iz Teksasa, koji je napao policijskog službenika – slinom. Iako se HIV ne prenosi slinom, muškarcu je dodijeljena zatvorska kazna zbog namjere da ošteti zdravlje službenika (Lehman, 2012).

2.1.1. Forenzička mikrobiologija u ostalim kaznenim djelima

Osim bioloških zločina, u kojima je sredstvo napada mikroorganizam ili toksični produkt (NRC, 2014; Jansen i sur., 2014), forenzička mikrobiologija može biti ključna i u ostalim kaznenim djelima (Schmedes i Budowle, 2019). Kako bi uzorak mogao dati ispravne podatke o određenom mikrobiološkom tragu, pravilno uzimanje uzoraka, transport, označavanje uzoraka jedinstvenim identifikatorima te pravovremena i stručna obrada iznimno su važni (Blondeau i sur., 2019).

U slučajevima seksualnog napada, valja sakupiti briseve ili uzorke tjelesnih tekućina, odjeću, dlake i predmete sa mjesta napada i ispitati ih tradicionalnim i/ili molekularnim testovima, a osobe testirati na spolno prenosive bolesti (Carter i sur., 2017; Frieden i sur., 2015; Jauregui i sur., 2016). U jednom slučaju seksualnog napada, silovatelj je osuđen, između ostalog, pomoću mikoloških profila analizom uzoraka s odjeće i obuće (Hawksworth i Wiltshire, 2011). Iako testiranje na spolno prenosive bolesti primarno služi za provjeru zdravlja žrtava i umanjivanje zabrinutosti, može postati forenzički značajno.

U slučajevima bolničkih infekcija, ovisno o uzročniku, ponekad je važno istražiti uzrok izbijanja i utvrditi potencijalno nesavjesno medicinsko postupanje. Tako je 2011., zbog izbijanja nozokomijalne transmisije karbapenem-rezistentne bakterije *Klebsiella pneumoniae*, pomoću genomske analize (WGS) dokazano da je zaraza izbila usprkos pravilnom provođenju dezinfekcije (Snitkin i sur., 2012; Carter i sur., 2017).

Sekvenciranje se ponekad koristi i za ispitivanje autentičnosti proizvoda na tržištu. Zahvaljujući sekvenciranju, otkrio se, primjerice, velik broj krivotvorenih kontaktnih leća, na kojima su nađeni uzročnici poput *Pseudomonas aeruginosa* i drugih (Land i sur., 2018; Blondeau i sur., 2019). Još jedan slučaj krivotvorenja, većih razmjera, dogodio se 2007. sa vjerojatno krivotvorenim zubnim pastama, u kojima je pronađeno više bakterijskih vrsta, poput *Pseudomonas*, *Serratia* i *Klebsiella* u visokim koncentracijama. Ta značajna kontaminacija potvrđena je mikroskopiranjem i

biokemijskim metodama, te je otprilike 200 000 proizvoda povučeno s tržišta (Brzezinski i Craft, 2012; Blondeau i sur., 2019).

2.2. Postmortem analize

Mikroorganizmi su sveprisutni, ali i svojstveni za određeni okoliš ili živa bića (Metcalf, 2019; Carter i sur., 2017). Daljnjim proučavanjem mikrobnih zajednica, te pojavom sekvenciranja sljedeće generacije (*engl. next generation sequencing*, NGS), postalo je jasno da mikroorganizmi, kao pokretač postmortalne razgradnje leša, mogu biti višestruko korisni u postmortalnim analizama (Gunn i Pitt, 2012; Lauber i sur., 2014; Carter i sur., 2017). Dinamika mikroorganizama može pomoći u određivanju vremena smrti (Metcalf, 2019; Carter i sur., 2017; Zečević i sur., 2018), uzroka smrti te dovesti do razjašnjenja brojnih drugih okolnosti vezanih uz smrt. Sudsko-medicinske procjene vremena smrti ili postmortalnog intervala (*engl. post-mortem interval*, PMI) (Gelderman i sur., 2018) osnivaju se prvenstveno na znakovima smrti i promjenama na lešu nakon smrti, ali i znakovima u okolini leša te drugim znakovima (Carter i sur., 2017; Zečević i sur., 2018). Precizna procjena PMI iznimno je bitna u istragama, a najčešće se procjenjuje kombinacijom što više čimbenika kako bi se „prozor“ - vremenski razmak u kojemu se smrt vjerojatno dogodila – što više suzio (Carter i sur., 2017; Zečević i sur., 2018). Iako znakovi smrti i postmortalne promjene pokazuju vremenske zakonitosti (Zečević i sur., 2018), čimbenici kao što su temperatura okoliša, vlaga, dostupnost kisika, izlaganje Sunčevoj svjetlosti, ukop u zemlji, građa i položaj pokojnika i način smrti mogu znatno utjecati na brzinu tih procesa (Carter i sur., 2007). To ovisi o pogodnosti okoliša za mikroorganizme. Naime, truljenje je najbrže pri srednjoj vlažnosti okoliša, uz temperaturu okoliša od 25°C do 30°C, odnosno uz tjelesnu temperaturu koju su navikli nastanjivati zbog optimalne enzimatske aktivnosti (Janaway i sur., 2009; Zečević i sur., 2018). Sekvenciranjem mikrobnih zajednica mogu se utvrditi zakonitosti koje bi činile „mikrobni sat“ (*engl. microbial clock*), čije bi ponašanje bilo vremenski određeno, kao što su ostale metode procjene (Metcalf i sur., 2013; Kupferschmidt, 2016). Studija na miševima pokazala je da bi se PMI mogao određivati do 25 dana od smrti, s pogreškom do 3 dana (Metcalf i sur., 2013). Ove

metode se, ipak, još ne koriste u svakodnevnoj praksi (National Institute of Justice, 2021; Blondeau i sur., 2019).

U razgradnji leša sudjeluju i eukarioti prisutni oko leša, na površini i unutar leša. (Janaway i sur., 2009; Carter i sur., 2017). Usto, poslije smrti, imunološki sustav prestaje djelovati (Janaway i sur., 2009; Carter i sur., 2017). Mikroorganizmi se postmortalno sele iz organa i tkiva koja su prvotno kolonizirali u velikom broju (napose crijeva) u druga, do tada mikrobiološki nenastanjena područja (Janaway i sur., 2009.). Taj proces naziva se postmortalna translokacija mikroorganizama (Gates i sur., 2021).

2.2.1. Utvrđivanje uzroka smrti

Kada osoba umre, ključno je utvrditi uzrok (stanje koje je neposredno dovelo do smrti) i način smrti (opisuje nastanak uzroka; nasilan ili prirodan) (Carter i sur., 2017; Zečević i sur., 2018). U svrhu utvrđivanja uzroka, a ponekad i načina smrti, uz obdukciju mogu se koristiti mikrobiološke analize. Tako se, primjerice, može razlikovati je li osoba umrla prirodno, uslijed bolesti ili nasilno, primjerice trovanjem (Gunn i Pitt, 2012; Carter i sur., 2017). Kako je već naglašeno, ove analize nisu isključivo u domeni forenzičke, već i istraživačke i kliničke mikrobiologije (Blondeau i sur., 2019).

Pri smrtima nepoznatog uzroka, važno je isključiti infektivni uzrok. Primjerice, ukoliko se smrt dogodila u bolničkom okruženju, kliničko-patološkom obdukcijom te serološkim ili genskim pretragama valja pronaći eventualnog uzročnika ili oštećenje organa (Rodriguez i sur., 2005; Carter i sur., 2017; Zečević i sur., 2018). Navedeno može biti značajno i za liječenje drugih bolničkih pacijenata. Ako je uzrok smrti bilo kojeg pokojnika infekcija, valja utvrditi patogen, radi poduzimanja eventualnih mjera prevencije (primjerice, ako se radilo o kontaminiranoj hrani) (Carter i sur., 2017). Vrlo bitan primjer utvrđivanja uzroka smrti je sindrom iznenadne smrti dojenčeta (*engl. Sudden Infant Death Syndrome, SIDS*), najčešći uzrok smrti djece do godinu dana starosti (Zečević i sur., 2018; Carter i sur., 2017). SIDS je obuhvaćen širim pojmom sindroma iznenadne i neočekivane smrti male djece (*engl. sudden unexpected death in infancy, SUDI*), koji, između ostalog, obuhvaća smrti male djece uslijed infekcije i drugih poznatih uzroka. (Collados-Ros i sur., 2021) Iako je poznato nekoliko rizičnih čimbenika, točan mehanizam pojave SIDS-a nije poznat. (Zečević i

sur., 2018). Neki autori navode da bi mikroorganizmi mogli imati ulogu u nekim slučajevima SIDS-a (Gleeson i Cripps, 2004; Carter i sur., 2017). Tako su, primjerice, u slučajevima SIDS-a u tkivima umrle dojenčadi nađeni humani herpesvirus-6 (HHV-6) i Epstein-Barr virus (EBV), koji su bili statistički značajno zastupljeniji u slučajevima SIDS-a u odnosu na tkiva dojenčadi umrle od drugih (poznatih) uzroka (Alvarez-Lafuente i sur., 2008, Collados-Ros i sur., 2021). Također je nađena i statistički značajna razlika u detekciji određenih antigena *Helicobacter pylori* u slučajevima SIDS-a u odnosu na živu dojenčad (Stray-Pedersen i sur., 2008; Collados-Ros i sur., 2021). Nadalje, određeni serotipovi *E. coli*, napose oni povezani s izvancrijevnim infekcijama, bili su češći kod SIDS-a nego u zdrave dojenčadi (Pearce i sur., 2010; Collados-Ros i sur., 2021). Nalaz *S. aureus* i njegovih toksina pokazao se značajno zastupljenijim u uzorcima fecesa u slučajevima SIDS-a u odnosu na kontrolne uzorke fecesa dojenčadi čiji su uzorci bili negativni na rutinski testirane patogene (Highet i Goldwater, 2009). Kasnije istraživanje (Highet i sur., 2014) uzoraka fecesa dojenčadi u slučajevima SIDS-a pokazalo je značajno veću zastupljenost *Clostridium difficile*, *Clostridium innocuum*, *Bacteroides thetaiotaomicron* te *Clostridium perfringens* (Collados-Ros i sur., 2021). Navedeno istraživanje je pokazalo i značajno veću zastupljenost *S. aureus* u dojenčadi koja je spavala na trbuhu u slučajevima SIDS-a nego u dojenčadi koja je spavala u drugim položajima, a pritom valja reći da je spavanje na trbuhu prepoznat rizični čimbenik za SIDS (Collados-Ros i sur., 2021; Zečević i sur., 2018).

Iz leševa u slučajevima SIDS-a često su izolirane i bakterije *Neisseria*, *Haemophilus*, *Streptococcus pneumoniae* te *Bordetella pertussis* (Speruda i sur., 2022).

Dokazivanje infekcije u slučajevima SIDS-a može pomoći ožalošćenima u procesu tugovanja (Carter i sur., 2017). Ipak, nalaz određenog mikroorganizma se smije se izjednačiti s uzrokom smrti već je potrebna detaljna analiza oštećenja organa i drugih okolnosti (Carter i sur., 2017; Zečević i sur., 2018).

Uostalom, već spomenuta mikrobna postmortalna translokacija ili kontaminacija iz okoliša mogu dovesti do pogrešnog dijagnosticiranja infekcije kao uzroka smrti (Janaway i sur., 2009; Carter i sur., 2017).

Kod slučajeva iznenadne smrti odraslih, koja je često popraćena obdukcijom, neki autori naglašavaju značajan udio infektivnih uzroka u ukupnom broju slučajeva iznenadnih smrti. Tako je u jednoj studiji od 56 iznenadnih smrti potvrđeno 20 slučajeva miokarditisa, 18 slučajeva bronhopneumonije, 5 meningokokcemija, te 4

virusne pneumonije. U drugoj su kao vodeći infektivni uzroci istaknuti pneumonija, sepsa, meningitis, peritonitis te apendicitis kompliciran perforacijom (Morentin i sur., 2012; Christoffersen, 2015; Blondeau i sur., 2019).

Pri pronalasku utopljenika, dijagnoza uzroka često je komplicirana, jer patološki znakovi, kada postoje, uglavnom mogu ukazati samo na nasilnu smrt. Analizom elektrolita se ponekad može grubo odrediti PMI. Karakteristična pretraga pri nalasku utopljenika je testiranje na alge kremenjašice – dijatomeje, koje se nalaze u vodama, ali i drugdje (Zečević i sur., 2018; Lehman i sur., 2012). Ako se dijatomeje nađu u tkivu (primjerice, plućima), valja ih usporediti s dijatomejama u vodi u kojoj je leš pronađen (Zečević i sur., 2018; Lehman i sur., 2012). Kako dijatomeja ima i u tlu, zraku i drugdje, a negativan nalaz nema velik značaj, različiti su stavovi glede uloge ovog testiranja, pa se predlaže nadopuna lančanom reakcijom polimeraze (*engl. polymerase chain reaction, PCR*). Međutim, to bi moglo dovesti do lažno pozitivnih rezultata (Zečević i sur., 2018; Lehman i sur., 2012). Osim navedenog, razmatrana je i analiza bakterioplanktona (Kakizaki i sur., 2011a, b). Testiranje na bakterioplankton može biti od pomoći kada su rezultati testa dijatomeja neodređeni (Lehman, 2012). Neki autori razmatrali su ulogu fekalnih bakterija u dijagnozi utapanja (Lucci i sur., 2008; Lehman i sur., 2012; Carter i sur., 2017).

Određivanje uzroka smrti dodatno je otežano varijabilnošću tanatomikrobioma. Stoga je potrebno nastaviti proučavati dinamiku mikroorganizama koji se mogu naći na ili u lešu i u njegovoj blizini. Mnoge bakterije i gljive mogu utjecati na toksikološke nalaze (primjerice, razgradnjom ksenobiotika ili stvaranjem alkohola i drugih derivata) te mogu poremetiti otkrivanje brojnih neinfektivnih uzroka smrti (Speruda i sur., 2022; Carter i sur., 2017).

K tome, mikroorganizmi su u međusobnoj interakciji, što utječe na sastav tanatomikrobioma – prisustvo određenih mikroorganizama pri obdukciji može biti uvjetovano prisustvom drugih mikroorganizama (Speruda i sur., 2022; Carter i sur., 2017).

2.3. Istraživanje prijenosa infektivnih uzročnika

Da bi se objasnilo širenje određene zarazne bolesti, često je potrebno pronaći izvor zaraze. Stoga je ključno odrediti mikrobní potpis, to jest, „otisak prsta“ (*engl. microbial fingerprint*) u mikrobiološkom uzorku (Lehman, 2012; Blondeau i sur., 2019; Interstate Technology Regulatory Council, 2011). *Fingerprinting* razlikuje mikroorganizme ili skupine mikroorganizama na temelju sličnih karakteristika – genskog materijala ili dijela biomolekule (kao što su fosfolipidi, DNA ili RNA) (Lehman, 2012). Treba naglasiti da se mikrobnim „otiskom prsta“ može postići precizna usporedba s referentnim genomom i praćenje mikroorganizama sve do njihova izvora (primjerice, ako su proučavani i referentni mikroorganizmi genetski dovoljno slični da se zaključi da su iz istog izvora) (Lehman, 2012). Ovaj princip, osim u gotovo svim suvremenim forenzičko-mikrobiološkim slučajevima, koristi se ponekad i u istragama izvora epidemije (ITRC, 2011; Blondeau i sur., 2019). Sposobnost retrogradnog praćenja prijenosa mikroorganizama do njihova izvora može se ilustrirati izbijanjem antraksa među korisnicima heroína u Škotskoj 2009.–2010. godine, koji su se proširili na Njemačku i Ujedinjeno Kraljevstvo. Kako bi se utvrdilo porijeklo zaraze, korišteni su otprije utvrđeni genetski mikrobní potpisi (polimorfizmi jednog nukleotida) kako bi se utvrdilo podrijetlo istraživaniog soja *B. anthracis*. Svi bolesnici u kojih je potvrđen *B. anthracis* dijelili su isti polimorfizam. Po filogeografskoj analizi, istraživani soj bio je usko povezan sa sojevima iz Turske, pa je zaključeno da se radilo o slučajnoj kontaminaciji duž rute krijumčarenja heroína u Europu (Price i sur, 2012; NRC, 2014).

3. Tehnike koje se koriste u forenzičkoj mikrobiologiji

3.1. Tradicionalne i suvremene metode

U forenzičkoj mikrobiologiji koriste se tradicionalne (klasične) i suvremene (molekularne) metode mikrobiološke analize, koje su jednake kao i u ostalim područjima mikrobiologije (Blondeau i sur., 2019; Carter i sur., 2017; Sibley i sur., 2012; Lehman, 2012).

Osnovna tradicionalna metoda je uzgoj mikroorganizama u kulturi, na različitim hranjivim podlogama. Nakon rasta u kulturi, mikroorganizam se može proučavati prema fenotipu i genotipu (Lagier i sur., 2015; Carter i sur., 2017).

Tradicionalne metode zasnovane su na proučavanju fenotipa (bilo rastom na specifičnim podlogama, bojenjem i mikroskopiranjem ili biokemijskim testovima) (Laupland i Valiquette, 2013). Međutim, fenotipske karakteristike nisu pouzdane za identifikaciju, pošto se mogu mijenjati ovisno o okolini. Suvremene metode se, stoga, temelje na genotipu, to jest, jedinstvenim varijacijama genoma (Lehman, 2012). Molekularne metode imaju brojne prednosti i sve više zamjenjuju tradicionalne (Adzitey i sur., 2013; Laupland i Valiquette, 2013; Ellington i sur., 2017).

U nastavku su opisani osnovni principi i primjeri molekularnih metoda, odnosno genotipizacije mikroorganizama.

3.1.1. Genotipizacija

Metode genotipizacije su sredstvo provođenja prethodno spomenute (DNA) *fingerprinting* analize. DNA "otisak prsta" ili DNA profiliranje, temelji se na jedinstvenim polimorfizmima mikrobnog genoma (Schürch i sur., 2018). Ponavljajući genetski elementi uključuju mikrosatelite ili kratka tandemska ponavljanja (*engl. short tandem repeats*, STR), minisatelite ili promjenjivi broj tandemskih ponavljanja (*engl. variable number tandem repeat*, VNTR), a razlikuju se prvenstveno na temelju veličine i obrasca ponavljanja. Za preciznu identifikaciju bakterija, presudni su polimorfizmi jednog nukleotida (Medicine Encyclopedia, 2022). Jedna od ranijih tehnologija pribavljanja podataka o genomu bila je metoda amplifikacije nukleinske kiseline – PCR. Princip rada PCR je izdvajanje, zatim umnožavanje fragmenata

nukleinske kiseline (DNA). Postoji nekoliko varijanti PCR, kao što su *multiplex* PCR (umnožava više DNA sekvenci istovremeno) i *real-time* kvantitativni PCR (qPCR) (mjeri količinu sekvenci koje se umnožavaju u stvarnom vremenu). *Real-time* qPCR je brza i osjetljiva tehnologija koja se pokazala učinkovitom za utvrđivanje mikrobnog „otiska prsta“ u forenzičkoj mikrobiologiji (NRC, 2014).

Jedna od metoda kojoj je temelj PCR je i spomenuta MLVA (*engl. multi-locus VNTR analysis*), koja analizira polimorfizme putem VNTR. Iako je manje specifična od SNP, uvelike je pomogla u istragama. Za detekciju SNP može se koristiti tehnika mikronizova (microarray) (CDC, 2016; Schmedes i Budowle, 2019; LaFramboise, 2009). PCR ima ograničenja, poput visoke osjetljivosti na kontaminaciju uzorka ili nemogućnosti utvrđivanja prethodno nepoznatog genetskog materijala. Ipak, PCR, to jest korak amplifikacije, sastavna je komponenta naprednijih metoda sekvenciranja (Garibyan i Avashia, 2013; CDC, 2022).

Gensko sekvenciranje omogućava detekciju ciljanog gena, ali i cijeloga genoma mikroorganizma. Prvotno se sekvenciranje izvodilo na mikroorganizmima uzgojenima u kulturi. U prirodi, međutim, rijetko se nalaze izolirani mikroorganizmi, pošto većina mikroorganizama živi u mikrobnim zajednicama (Carter i sur., 2017). Analiza tih zajednica, u sastavu u kojem ih nalazimo u okolišu, moguća je uz NGS (Carter i sur., 2017). Ovakvo sekvenciranje ima mnoge prednosti. Prva prednost je što ne zahtijeva uzgoj pa uvelike skraćuje vrijeme potrebno za identifikaciju te olakšava identifikaciju mikroorganizama koje je teško uzgojiti ili se ne mogu uzgojiti (primjerice anaerobi ili *Nocardia spp.*) (Persing i sur., 2016). Nadalje, sekvenciranjem se mogu identificirati i živi i mrtvi organizmi, i to na razini soja (Carter i sur., 2017; Schmedes i Budowle, 2019; Laupland i Valiquette, 2013). Glavni napredak sekvenciranja u odnosu na PCR je što se sekvenciranjem može odrediti nepoznati nukleotidni slijed uzroka DNA, a ne samo pozitivan ili negativan rezultat traženja određenog fragmenta (Garibyan i Avashia, 2013; Schmedes i Budowle, 2019; Carter i sur., 2017; Heather i Chain, 2016). U skladu s time, sekvenciranjem je omogućena istovremena identifikacija uzročnika polimikrobnih infekcija. Osjetljivost sekvenciranja može se iskoristiti u praćenju djelovanja antibiotika (Persing i sur., 2016). Prva revolucionarna metoda (prve generacije sekvenciranja) bila je Sangerova metoda „prekinutih lanaca“ (DNA), a uz konstantna unaprijeđenja razvila se i druga generacija sekvenciranja (NGS), koja se od prve razlikuje po mogućnosti masovnog sekvenciranja velikih količina DNA istovremeno (Persing i sur., 2016).

Postoji i treća generacija, koja se ne razlikuje znatno od druge, ali se navodi mogućnost sekvenciranja jedne molekule (*engl. single molecule sequencing, SMS*) i odvijanja procesa u stvarnom vremenu. Unutar svake generacije postoje brojne različite tehnike, no u ovom radu navode se samo najčešće primjenjivanje u forenzičkoj mikrobiologiji (Heather i Chain, 2016).

Danas se u svrhu genotipizacije uglavnom koriste tehnike sekvenciranja sljedeće generacije (NGS) koje se još naziva i masivno paralelno sekvenciranje (*engl. massive parallel sequencing, MPS*) (Schmedes i Budowle, 2019). Jedna takva često korištena tehnika je i 16S ili 18S ribosomsko (rRNA) sekvenciranje za identifikaciju bakterija na temelju kratkog nukleotidnog slijeda gena 16S rRNA, očuvanog među gotovo svim bakterijskim rodovima i većini vrsta, pa služi za filogenetsku analizu. Još neke tehnike su polimorfizam jednog nukleotida (SNP) za detekciju sojeva unutar vrste bakterija te sekvenciranje cijelog genoma (WGS) koje služi za sastavljanje cjelovitog genoma (Muhamad Rizal i sur., 2020; Carter i sur., 2017; Blondeau i sur., 2019; CDC, 2022; Schmedes i Budowle, 2019).

Vjerojatno je da će suvremene metode, naročito NGS i WGS, uskoro imati još veću ulogu forenzičkoj mikrobiologiji (Blondeau i sur., 2019), pošto su brze, osjetljive i specifične. Današnja ograničenja ovih metoda su, osim cijene, to što zahtijevaju striktnu kontrolu kvalitete kako ne bi došlo do pogrešnih očitavanja i što ne razlikuju nevjabilne od vijabilnih organizama. Tako pogrešna interpretacija nalaza sekvenciranja može proizaći upravo iz velike osjetljivosti metode – postoji rizik zamjene infekcije kontaminacije uzorka s uzročnikom infekcije (recimo, pri nalazu *Propionibacterium acnes* ili koagulaza-negativnih stafilokoka) (Persing i sur., 2016). Zbog toga, laboratorij koji obavlja sekvenciranje treba procijeniti relevantnost nalaza uz pomoć drugih metoda ili kliničkih pokazatelja. Ove suvremene metode sekvenciranja zahtijevaju posebne vještine analitičara, kao što je poznavanje bioinformatike (Carter i sur., 2017; Robinson i sur., 2021).

3.1.2. Ostale molekularne metode

Iako se zasnivaju na bazi fenotipa, neke molekularne metode ipak prednjače nad metodama koje analiziraju genom – no razlog nije manjak sofisticiranosti metode, već sastav i svojstva molekula (NRC, 2014). Među te fenotipske metode mogu se ubrojiti one koje izvode detekciju proteina, protutijela ili antigena, kao što je

elektrokemiluminiscencija (*engl. electrochemiluminescence*, ECL), koja se koristi u otkrivanju proteinskih toksina, primjerice, botulinum-toksina ili ricina (Schaudies, 2014; NRC, 2014). Druga metoda za detekciju spojeva koji nisu nukleinske kiseline je masena spektrometrija, a rabi se u proučavanju kemijskih procesa i sastava mikroorganizama (Seng i sur., 2009; Carter i sur., 2017). Tehnika masene spektrometrije MALDI-TOF (*engl. matrix-assisted laser desorption/ionization; MALDI-time of flight*), poslužila je CDC-u u svrhu identifikacije proteinskih toksina *B. anthracis* i *C. botulinum* te terapijske primjene imunoglobulina u oboljelih (Boyer i sur., 2011; Kalb i sur., 2011; NRC, 2014; Blondeau i sur., 2019). Postoje i metode kombinirane analize nukleinskih kiselina i drugih molekula, primjerice, masena spektrometrija zajedno s PCR-om (NRC, 2014).

3.2. Forenzički relevantni mikroorganizmi

Mikroorganizmi se, napose nakon brojnih istraživanja njihove ekologije, smatraju vrstom fizičkog dokaza u forenzici. Naime, mikroorganizmi su posvuda, ali uz određene zakonitosti. Kako u različitim staništima možemo naći različite mikrobne zajednice, čime je moguće odrediti geološku lokaciju, tako je moguća i identifikacija ljudi na temelju njihova mikrobioma (Fierer i sur., 2010; Nagasawa i sur., 2013; Song i sur., 2013; Lax i sur., 2014; Tridico i sur., 2014; Bouslimani i sur., 2015; Lax i sur., 2015; Carter i sur., 2017). No, zajednice mikroorganizama se mijenjaju, a uz iznimnu moć prilagodbe na nove ili nepovoljne uvjete, identifikacija može biti otežana (Wilkins i sur., 2017; Carter i sur., 2017).

Uz prethodno navedene molekularne metode i dosadašnje primjere, jasno je da gotovo svaki mikroorganizam ili njihov produkt može postati predmetom interesa forenzičke mikrobiologije. Ipak, najviše proučavane su zajednice bakterija (NRC, 2014; Carter i sur., 2017; Schmedes i Budowle, 2019).

3.2.1. Bakterije

Forenzički najznačajnije bakterije mogu se podijeliti u 3 velike skupine (phyla). To su Actinomycetota (ranije *Actinobacteria*), *Bacillota* (ranije

Firmicutes) i *Pseudomonadota* (ranije *Proteobacteria*) (Carter i sur., 2017; Oren i Garrity, 2021). Unutar tih skupina, osim taksonomski, bakterije mogu biti podijeljene prema obliku, metabolizmu ili funkciji. U ovom radu su, međutim, istaknuti forenzički i klinički najbitniji rodovi.

Actinomycetota uključuje većinom Gram pozitivne bakterije, različitih afiniteta za kisik, koji nastanjuju tlo, vodu i kožu. Mnogi poznati rodovi pripadnici su reda *Actinobacteriales* – primjerice *Corynebacterium spp.*, *Micrococcus spp.* i *Mycobacterium spp.* (Brown, 2015; Carter i sur., 2017). Neke od bakterija ove skupine zanimljive su u forenzici zbog uočene dosljednosti u broju u procesima raspadanja (Carter i sur., 2014; Carter i sur., 2017). U ovoj skupini valja istaknuti i *Propionibacterium spp.*

U skupinu *Bacillota* ubrajaju se Gram pozitivne, heterotrofne aerobne, anaerobne i aerotolerantne bakterije zastupljene u tlu, koži i sluznicama (posebno gastrointestinalnog trakta) (Magne i sur., 2020; Carter i sur., 2017). U razred *Bacilli* spadaju neki forenzički značajni rodovi. Jedan je *Lactobacillus spp.*, koji može biti od velike važnosti pri utvrđivanju spolnog kontakta ili identifikacije vaginalnog sekreta (Fleming i Harbison, 2010; Tridico i sur., 2014; Williams i Gibson, 2019; Gouello i sur., 2021; Carter i sur., 2017). Drugi rod je *Bacillus spp.*, aerobne bakterije sa sposobnošću stvaranja endospora, gdje spada i značajni *Bacillus anthracis*. Od anaeroba koji stvaraju endospore, valja navesti *Clostridium spp.* (Carter i sur., 2017), budući da su ove bakterije redovito dio postmortalnih procesa (Pechal i sur., 2014; Metcalf i sur., 2016; Carter i sur., 2017; Robinson i sur., 2021). Usto, mnoge vrste unutar roda *Clostridium*, primjerice *C. botulinum*, mogu imati medicinski i pravni značaj (Carter i sur., 2017; Bai i sur., 2018).

Skupina *Bacillota* uključuje i razred koka, s rodovima kao što su *Streptococcus*, *Enterococcus* i *Staphylococcus* (Integrated Taxonomic Information System, 2022; Carter i sur., 2017).

Najraznovrsnija je skupina *Pseudomonadota*, kako zbog staništa (nastanjuju tlo, vode i životinje), tako i zbog velike metaboličke raznolikosti. Zajedničko ovim vrstama jest da su Gram negativne. Kako ovaj *phylum* uključuje brojne vrste sa širokim spektrom karakteristika, klasifikacija nije jednostavna (Carter i sur., 2017; Integrated Taxonomic Information System, 2022; Rizzatti i sur., 2017). Forenzički najznačajniji rodovi su *Escherichia spp.* (važan dio mikrobioma gastrointestinalnog sustava) (Martinson i Walk, 2020), *Proteus spp.* (sudjeluje u privlačenju insekata u

procesu postmortalne razgradnje) (Zheng i sur., 2013) te *Pseudomonas* spp., *Campylobacter* spp. i *Salmonella* spp.

Mnoge su bakterije ove skupine (primjerice, nitrificirajuće) raširene oko grobnog tla (Anderson i sur., 2013; Carter i sur., 2017). Štoviše, upravo su se bakterije iz skupine *Pseudomonadota* pokazale korisnima za primjenu „mikrobnog sata“, pošto su tijekom procesa postmortalne razgradnje s vremenom postale dominantna skupina u uzorku, dok je broj bakterija druge dvije skupine opadao (Guo i sur., 2016).

3.2.2. Ostali mikroorganizmi

Među ostalim forenzički relevantnim organizmima, gljive su najčešće istraživane zbog uloge u procesu raspada tijela gdje mogu poslužiti kao dokaz (Carter i sur., 2017; Chimutsa i sur., 2015; Olakanye i sur., 2015; Metcalf i sur., 2016; Hawksworth i Wiltshire, 2011; Wiltshire i sur., 2014; Young i sur., 2015).

Osim mikroorganizama, za forenziku su bitni i eukarioti, kao što su već spomenute dijatomeje. Iznimno važne su i životinje, primjerice insekti, drugi člankonošci i njihove ličinke, kojima se bavi se forenzička entomologija (Matuszewski, 2021; Aubernon i sur., 2018; Amendt i sur., 2011; Joseph i sur., 2011; Carter i sur., 2017; Zečević i sur., 2018).

3.3. Obdukcijaska mikrobiologija

U forenzici, da bi dokaz bio valjan i pogodan za korištenje u kazneno-pravnim postupcima, mora se ispoštovati lanac skrbništva. Lanac skrbništva (*engl. chain of custody*) podrazumijeva adekvatno čuvanje, transport, analizu i kontrolu dokaza, uz pažljivo i kronološki točno dokumentiranje. Neizmjerna je i važnost ispravne identifikacije uzorka, odnosno povezivanje s ispravnom osobom ili slučajem (Lehman, 2012; Blondeau i sur., 2019; Badiye i sur., 2022). Pošto se mikrobiološki uzorci i u kliničko-patološkoj i u sudskoj-medicinskoj obdukciji tretiraju jednako u pogledu mikrobiološke analize, u prikupljanju uzoraka mogu se primijeniti smjernice Europskog društva za mikrobiologiju i zarazne bolesti (*engl. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, ESCMID*), koje su nastale u suradnji s

Istraživačkom skupinom za forenziku i postmortalnu mikrobiologiju (*engl. Study Group for Forensic and Post-mortem Microbiology, ESGFOR*) te Europskim društvom za patologiju (*engl. European Society of Pathology, ESP*) (Fernandez-Rodríguez i sur., 2019). Valja napomenuti da se u nastavku opisane mikrobiološke analize vrše ako za to postoje indikacije, to jest ako sumnjamo na određeni uzrok (primjerice, infekciju). Ove metode ne preporuča se izvoditi rutinski pri svakoj obdukciji, pošto sam pronalazak uzročnika bez drugih pokazatelja ne doprinosi puno konačnom nalazu (Riedel, 2014). Tako se primjerice pri procjeni PMI preporuča uzeti bris površine leša te bris nosa i ušiju, pohranjene u odgovarajućim tekućim medijima (Fernandez-Rodríguez i sur., 2019). Uzorke tkiva i organa treba uzeti u obliku komada volumena 1 cm³ i zatim ih pohraniti zasebno u sterilne posude. Uzorci krvi uzimaju se iz srca i femoralne vene, a pohranjuju u epruvetama s dodatkom EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina) (Fernandez-Rodríguez i sur., 2019). Također treba uzeti uzorak zemlje do 5 cm dubine, za usporedbu, i pohraniti u sterilnu posudu. Sve ove uzorke valja poslati na molekularnu analizu. Kod sumnje na smrt zbog ili istovremeno s infekcijom, brisevi te uzorci krvi i tkiva se, uz određene specifičnosti, uzimaju na sličan način kako je opisano za PMI. Analize su nešto iscrpnije; radi se uzgoj u kulturi, serološki i antigenski testovi te molekularne analize (Fernandez-Rodríguez i sur., 2019). Kod sumnje na sepsu, prije započete obdukcije uzimaju se krv, cerebrospinalni likvor, urin i brisevi ždrijela u sterilne epruvete, a zatim je postupak za uzimanje tkiva sličan kao u prethodnom primjeru, uz dodatne uzorke visceralnih organa koje treba pohraniti u formalinu za histopatološku analizu (Fernandez-Rodríguez i sur., 2019). Ovdje se također provode postupci uzgoja u kulturi, serološke analize, antigenski testovi i primjenjuju molekularne metode. Postoje zasebne upute za druge slučajeve (SIDS, slučajeve seksualnog napada i drugo) (Carter i sur., 2017; Fernandez-Rodríguez i sur., 2019).

Za forenzičko-mikrobiološka istraživanja razgradnje ljudskog leša, uglavnom se danas koriste životinjski modeli, kao što su štakori, ribe ili svinje, ali u Sjedinjenim Američkim Državama i Australiji postoje programi darivanja leševa u tu svrhu (Robinson i sur., 2021; Carter i sur., 2017; NRC, 2014; Lehman, 2012).

4. Postmortalna translokacija mikroorganizama

Tumačenje postmortalnih kultura može biti komplicirano, pošto nalaz određenog mikroorganizma ne mora značiti zarazu ili uzrok smrti. Tako i izolacija mikroorganizama sa (za života) sterilnih tjelesnih odjeljaka može biti posljedica postmortalne translokacije (Lehman, 2012; Carter i sur., 2017).

Taj fenomen, nazvan i postmortalna transmigracija, označava kretanje bakterija sa sluznica i tkiva u krvotok nakon prestanka cirkulacije, odnosno smrti. Tkiva iz kojih se događa translokacija, pritom, ne moraju biti vidno oštećena – dokazana je translokacija i uz cjelovitu stijenku crijeva, no pretpostavlja se da tome doprinose ishemija, povećana propusnost stijenke i drugi čimbenici (Riedel, 2014; Lehman, 2012; Carter i sur., 2017). Bakterijska translokacija detaljno je opisana pojava u živih (primjerice postoperativno) (Doudakmanis i sur., 2021), ali je još uvijek nerazjašnjena kao postmortalni proces.

Postmortalnu translokaciju bitno je uzeti u obzir pri obdukciji. Naime, zbog velike vjerojatnosti dobivanja nalaza pozitivnih hemokultura postmortalno, treba ih uzimati selektivno, pri sumnji na zarazu (Riedel, 2014). U slučaju sumnje na infektivnog uzročnika, uzimanju uzorka valja pristupiti što prije i pritom primijeniti sterilnu tehniku (Riedel, 2014; Carter i sur., 2017; Fernandez-Rodríguez i sur., 2019). Usto, translocirane bakterije mogu potencijalno ugroziti obducenta ili čak primatelja organa (ako se s leša eksplantira organ), ako se ne poduzimaju prikladne mjere opreza (Carter i sur., 2017).

5. Zaključak

Forenzička znanost koristi se znanstvenim pristupom pri prikupljanju i analizi dokaza, te doprinosi u rješavanju kazneno-pravnih pitanja (NRC, 2014). Forenzička mikrobiologija je grana forenzike zadužena za one slučajeve u kojima mikroorganizmi mogu predstavljati fizički dokaz (Carter i sur., 2017; Robinson i sur., 2021). Brojni su takvi slučajevi već otkriveni, a primjene forenzičke mikrobiologije sve su različitije – mikroorganizmi se pokazuju kao sve pouzdaniji i informativniji trag (Schmedes i Budowle, 2019; Alan i Sarah, 2012; Carter i sur., 2017). Naime, pretpostavlja se da čovjeka nastanjuje jednako ili više mikroorganizama nego što ima tjelesnih stanica. Osim ljudi, mikrobne zajednice nastanjuju sva ostala živa bića i staništa, te su često specifične za svoje stanište (Carter i sur., 2017; Robinson i sur., 2021; Gilbert i sur., 2018; Blondeau i sur., 2019). Usto, prijenos mikroorganizama na objekte puno je efikasniji nego što je prijenos ljudske DNA, koji je često minimalan. To je u srazu s vjerovanjem javnosti, poznatim i kao CSI (*engl. Crime Scene Investigation*) efekt, da je tragove ljudske DNA moguće naći svugdje te da je rezultat lako pridružiti nekoj osobi (Cole, 2018; Blondeau i sur., 2019). Može se, dakle, reći da mikroorganizmi imaju vlastiti „potpis“, ili „otisak prsta“ kojeg treba odrediti u uzorku (Blondeau i sur., 2019). Pojava suvremenih metoda sekvenciranja te genotipizacije uvelike je unaprijedila razvoj forenzičke mikrobiologije, pa je genetski materijal mikroorganizama također moguće povezati s identitetom osobe ili geolokacijom, ali i pronaći izvor određenog patogena u slučaju bioterorizma, bioloških zločina ili prirodnog izbijanja epidemije te ostalih zločina (Robinson i sur., 2021). Osim samog otkrivanja počinjenih bioloških ili drugih zločina, potrebno je nastaviti razvijati mehanizme nadzora nad biološkim prijetnjama (NRC, 2014). Pomoću ponašanja mikrobnih zajednica (uz molekularne metode) može se utvrditi vrijeme i uzrok smrti (Schmedes i sur., 2016; Blondeau i sur., 2019; Robinson i sur., 2021; Carter i sur., 2017). Postoje mnoge druge primjene, a sve je više obećavajućih istraživanja u ovom području. Usprkos tome, zbog složenosti uzorkovanja i analize, velik dio ovih metoda još se ne radi rutinski (Robinson i sur., 2021; Carter i sur., 2017). Uz tehnička ograničenja, postoje i određene nedoumice oko interpretacije forenzičko-mikrobioloških nalaza, pošto trenutno ne postoje univerzalne i cjelovite smjernice (Schmedes i Budowle, 2019, Blondeau i sur., 2019). Većina mikrobiologa bavi se znanstveno-istraživačkim ili kliničkim radom te uglavnom nisu dovoljno upoznati sa

sudsko-medicinskim načelima, stoga ih je važno educirati o postupanju s uzorcima od pravnog značaja i zaštiti javnog zdravlja u slučaju epidemije, napada biološkim agensima i slično (Lee i sur., 2020; CDC, 2018; Schmedes i Budowle, 2019).

6. Zahvale

Zahvaljujem svojoj mentorici, profesorici Ani Budimir, na susretljivosti, savjetima i trudu uloženom u pripremu i ispravljanje ovog rada. Zahvaljujem, također, svojim kolegama na nesebičnoj pomoći, savjetima i prijateljstvu. Hvala mome Goranu na beskrajnom strpljenju, mudrosti i radosti. Naposljetku, hvala mojoj obitelji na brojnosti, zajedništvu, gorljivosti, humoru i uvijek dostupnom drugom mišljenju.

7. Literatura

1. Adzitey, F., Huda, N., & Ali, G. R. (2013). Molecular techniques for detecting and typing of bacteria, advantages and application to foodborne pathogens isolated from ducks. *3 Biotech*, 3(2), 97–107. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0074-4>
2. Alan, G., & Sarah, J. P. (2012). Microbes as forensic indicators. *Tropical biomedicine*, 29(3), 311–330.
3. Alvarez-Lafuente, R., Aguilera, B., Suarez-Mier, M.A. et al. (2008) Detection of human herpes-virus-6, Epstein-Barr virus and cytomegalovirus in formalin-fixed tissues from sudden infant death: a study with quantitative real-time PCR. *Forensic Science International*, 178 (2–3), 106–111.
4. Amendt, J., Richards, C. S., Campobasso, C. P., Zehner, R., & Hall, M. J. (2011). Forensic entomology: applications and limitations. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, 7(4), 379–392. <https://doi.org/10.1007/s12024-010-9209-2>
5. American Society for Microbiology. [Internet] Sentinel level clinical microbiology laboratory guidelines. https://asm.org/ASM/media/Policy-and-Advocacy/Biosafety_Sentinel_Guideline_October_2018_FINAL.pdf
6. Anderson, B., Meyer, J. and Carter, D.O. (2013) Dynamics of ninhydrin-reactive nitrogen and pH in gravesoil during the extended postmortem interval. *Journal of Forensic Sciences*, 58, 1348–1352.
7. Aubernon, C., Hedouin, V., & Charabidze, D. (2018). The maggot, the ethologist and the forensic entomologist: Sociality and thermoregulation in necrophagous larvae. *Journal of Advanced Research*, 16, 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.12.001>
8. Australia New Zealand Policing Advisory Agency (2022), <https://www.anzpaa.org.au/forensic-science/forensic-sciences/forensic-science-disciplines>

9. Badiye A., Kapoor N., Menezes RG. (2022) Chain of Custody. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551677/>
10. Bai, L., Peng, X., Liu, Y., Sun, Y., Wang, X., Wang, X., Lin, G., Zhang, P., Wan, K., & Qiu, Z. (2018). Clinical analysis of 86 botulism cases caused by cosmetic injection of botulinum toxin (BoNT). *Medicine*, 97(34), e10659. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000010659>
11. Bernard, E. J., Azad, Y., Vandamme, A. M., Weait, M., & Geretti, A. M. (2007). HIV forensics: pitfalls and acceptable standards in the use of phylogenetic analysis as evidence in criminal investigations of HIV transmission. *HIV Medicine*, 8(6), 382–387. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1293.2007.00486.x>
12. Blackwell, C. (2004) Infection, inflammation, and SIDS. *FEMS Pathogens and Disease*, 42 (1), 1–2.
13. Blondeau, L. D., Rubin, J. E., Deneer, H., Kanthan, R., Sanche, S., Hamula, C., & Blondeau, J. M. (2019). Forensic, investigative and diagnostic microbiology: similar technologies but different priorities. *Future Microbiology*, 14, 553–558. <https://doi.org/10.2217/fmb-2019-0088>
14. Bokhari H. (2018) Exploitation of microbial forensics and nanotechnology for the monitoring of emerging pathogens, *Critical Reviews in Microbiology*, 44:4, 504-521, DOI: 10.1080/1040841X.2018.1444013
15. 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 of the United States of America*, 112, E2120–E2129.
16. Boyer, A. E., M. Gallegos-Candela, R. C. Lins, Z. Kuklenyik, H. M. Woolfitt, S. Kalb, C. P. Quinn, and J. R. Barr. (2011) Quantitative mass spectrometry for bacterial protein toxins—a sensitive, specific, high-throughput tool for detection and diagnosis. *Molecules* 16:2391-2413.

17. Brown, J.W. (2015) *Principles of Microbial Diversity*, American Society for Microbiology Press, Washington, DC.
18. Brzezinski J.L., Craft D.L. (2012) Characterization of microorganisms isolated from counterfeit toothpaste. *J. Forensic Sci.* 57(5), 1365–1367
19. Carter, D. O., Yellowlees, D., & Tibbett, M. (2007). Cadaver decomposition in terrestrial ecosystems. *Die Naturwissenschaften*, 94(1), 12–24.
<https://doi.org/10.1007/s00114-006-0159-1>
20. Carter, D.O., Knight, R. and Metcalf, J.L. (2014) A preliminary survey of a postmortem skin microbiome on Oahu. *Proceedings of 66th Annual Meeting of the American Academy of Forensic Sciences*, vol. 20, Seattle, WA, February 17–22, 2014, American Academy of Forensic Sciences, Colorado Springs, CO, pp. 361–362.
21. Carter D.O., Tomberlin J.K., Benbow M.E., Metcalf J.L. (2017), *Forensic Microbiology*, John Wiley and Sons Ltd, Chichester
22. Centers for Disease Control and Prevention. [Internet] Bioterrorism agents/diseases. <https://emergency.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp>
23. Centers for Disease Control and Prevention. [Internet]
<https://www.cdc.gov/pulsenet/pdf/genome-sequencing-508c.pdf>
24. Centers for Disease Control and Prevention (2016)
<https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/mlva.html>
25. Centers for Disease Control and Prevention (2018)
<https://emergency.cdc.gov/bioterrorism/prep.asp>
26. Chimutsa, M., Olakanye, A.O., Thompson, T.J.U. and Komang Ralebitso-Senior, T. (2015) Soil fungal community shift evaluation as potential cadaver decomposition indicator. *Forensic Science International*, 257, 155–159.

27. Christoffersen S. (2015) The importance of microbiological testing for establishing cause of death in 42 forensic autopsies. *Forensic Sci. Int.* 250, 27–32
28. Cole S. A. (2015). A surfeit of science: The "CSI effect" and the media appropriation of the public understanding of science. *Public understanding of science (Bristol, England)*, 24(2), 130–146. <https://doi.org/10.1177/0963662513481294>
29. Collados-Ros, A., Pérez-Cárceles, M. D., & Legaz, I. (2021). Is There a Role for the Microbiome and Sudden Death? A Systematic Review. *Life (Basel, Switzerland)*, 11(12), 1345. <https://doi.org/10.3390/life11121345>
30. Doudakmanis, C., Bouliaris, K., Kolla, C., Efthimiou, M., & Koukoulis, G. D. (2021). Bacterial translocation in patients undergoing major gastrointestinal surgery and its role in postoperative sepsis. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, 12(6), 106–114. <https://doi.org/10.4291/wjgp.v12.i6.106>
31. Ellington, M. J., Ekelund, O., Aarestrup, F. M., Canton, R., Doumith, M., Giske, C., Grundman, H., Hasman, H., Holden, M., Hopkins, K. L., Iredell, J., Kahlmeter, G., Köser, C. U., MacGowan, A., Mevius, D., Mulvey, M., Naas, T., Peto, T., Rolain, J. M., Samuelsen, Ø., Woodford, N. (2017). The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST Subcommittee. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 23(1), 2–22. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.11.012>
32. Federal Bureau of Investigation (2010) <https://www.justice.gov/archive/amerithrax/docs/amx-investigative-summary2.pdf>
33. Fernández-Rodríguez, A., Burton, J. L., Andreoletti, L., Alberola, J., Fornes, P., Merino, I., Martínez, M. J., Castillo, P., Sampaio-Maia, B., Caldas, I. M., Saegeman, V., Cohen, M. C., & ESGFOR and the ESP (2019). Post-mortem microbiology in sudden death: sampling protocols proposed in different clinical settings. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of*

Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 25(5), 570–579.

<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.08.009>

34. 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.

35. Fleming, R. I., & Harbison, S. (2010). The use of bacteria for the identification of vaginal secretions. *Forensic Science International. Genetics*, 4(5), 311–315.

<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2009.11.008>

36. Frieden, T.R., Jaffe, H.W. and Cono, J. (2015) Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, in *Morbidity and Mortality Weekly Report* (ed S.A. Rasmussen), Center for Surveillance, Epidemiology, and Laboratory Services, Centers for Disease Control and Prevention, US Department of Health and Human Services, Atlanta

37. Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. *The Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), 1–4. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>

38. Gates, L., Klein, N. J., Sebire, N. J., & Alber, D. G. (2021). Characterising Post-mortem Bacterial Translocation Under Clinical Conditions Using 16S rRNA Gene Sequencing in Two Animal Models. *Frontiers in Microbiology*, 12, 649312.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.649312>

39. Gelderman, H. T., Boer, L., Naujocks, T., IJzermans, A., & Duijst, W. (2018). The development of a post-mortem interval estimation for human remains found on land in the Netherlands. *International Journal of Legal Medicine*, 132(3), 863–873.

<https://doi.org/10.1007/s00414-017-1700-9>

40. Gilbert, J. A., Blaser, M. J., Caporaso, J. G., Jansson, J. K., Lynch, S. V., & Knight, R. (2018). Current understanding of the human microbiome. *Nature Medicine*, 24(4), 392–400. <https://doi.org/10.1038/nm.4517>

41. Gleeson, M. and Cripps, A.W. (2004) Development of mucosal immunity in the first year of life and relationship to sudden infant death syndrome. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 42 (1), 21–33.
42. Gouello, A., Dunyach-Remy, C., Siatka, C., & Lavigne, J. P. (2021). Analysis of Microbial Communities: An Emerging Tool in Forensic Sciences. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 12(1), 1. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12010001>
43. Gunn, A. and Pitt, S.J. (2012) Microbes as forensic indicators. *Tropical Biomedicine*, 29, 311–330. Haefner, J.N., Wallace, J.R. and Merritt, R.W. (2004) Pig decomposition in lotic aquatic systems: the potential use of algal growth in establishing a postmortem submersion interval (PMSI). *Journal of Forensic Science*, 49, 330–336.
44. Guo, J., Fu, X., Liao, H., Hu, Z., Long, L., Yan, W., Ding, Y., Zha, L., Guo, Y., Yan, J., Chang, Y., & Cai, J. (2016). Potential use of bacterial community succession for estimating post-mortem interval as revealed by high-throughput sequencing. *Scientific Reports*, 6, 24197. <https://doi.org/10.1038/srep24197>
45. Hawksworth, D.L. and Wiltshire, P.E. (2011) Forensic mycology: the use of fungi in criminal investigations. *Forensic Science International*, 206 (1–3), 1–11.
46. Heather, J. M., & Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003>
47. Higgins, J. A., Cooper, M., Schroeder-Tucker, L., Black, S., Miller, D., Karns, J. S., Manthey, E., Breeze, R., & Perdue, M. L. (2003). A field investigation of *Bacillus anthracis* contamination of U.S. Department of Agriculture and other Washington, D.C., buildings during the anthrax attack of October 2001. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), 593–599. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.593-599.2003>

48. Highet, A. R., & Goldwater, P. N. (2009). Staphylococcal enterotoxin genes are common in *Staphylococcus aureus* intestinal flora in Sudden Infant Death Syndrome (SIDS) and live comparison infants. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 57(2), 151–155. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2009.00592.x>
49. Highet, A. R., Berry, A. M., Bettelheim, K. A., & Goldwater, P. N. (2014). Gut microbiome in sudden infant death syndrome (SIDS) differs from that in healthy comparison babies and offers an explanation for the risk factor of prone position. *International Journal of Medical Microbiology : IJMM*, 304(5-6), 735–741. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.05.007>
50. Huber J., Crawford T. (2009) Murder verdict in HIV case sets off alarms; First in Canada. *National Post* (Canada). April 6; Sect. A:1.
51. Integrated Taxonomic Information System (ITIS) (2022) https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=956120#null
52. Interstate Technology Regulatory Council (2011) https://itrcweb.org/Documents/team_emd/Microbial_Fingerprinting_Fact_Sheet.pdf
53. Janaway, R.C., Percival, S.L. and Wilson, A. (2009) Decomposition of Human Remains, in *Microbiology and Aging: Clinical Manifestations* (ed S.L. Percival), Humana Press, Totowa.
54. Jansen, H. J., Breeveld, F. J., Stijnis, C., & Grobusch, M. P. (2014). Biological warfare, bioterrorism, and biocrime. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 20(6), 488–496. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12699>
55. Jauregui, F., Chariot, P., Vessieres, A. and Picard, B. (2016) Prevalence of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections detected by real-time PCR among individuals reporting sexual assaults in the Paris, France area. *Forensic Science International*, 266, 130–133.

56. Joseph, I., Mathew, D. G., Sathyan, P., & Vargheese, G. (2011). The use of insects in forensic investigations: An overview on the scope of forensic entomology. *Journal of Forensic Dental Sciences*, 3(2), 89–91.
<https://doi.org/10.4103/0975-1475.92154>
57. Kakizaki E., Kozawa S., Matsuda H., Muraoka E., Uchiyama T., Sakai M., et al. (2011a) In vitro study of possible microbial indicators for drowning: salinity and types of bacterioplankton proliferating in blood. *Forensic Sci Int*. 204:80-7.
58. Kakizaki E., Kozawa S., Imamura N., Uchiyama T., Nishida S., Sakai M., et al. (2011b) Detection of marine and freshwater bacterioplankton in immersed victims: postmortem bacterial invasion does not readily occur. *Forensic Sci Int*. 211:9-18.
59. Kalb, S. R., W. I. Santana, I. N. Geren, C. Garcia-Rodriguez, J. Lou, T. J. Smith, J. D. Marks, L. A. Smith, J. L. Pirkle, and J. R. Barr. (2011) Extraction and inhibition of enzymatic activity of botulinum neurotoxins /B1, /B2, /B3, /B4, and /B5 by a panel of monoclonal anti-BoNT/B antibodies. *BMC Biochemistry* 12:58.
60. Keim, P., Price, L. B., Klevytska, A. M., Smith, K. L., Schupp, J. M., Okinaka, R., Jackson, P. J., & Hugh-Jones, M. E. (2000). Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology*, 182(10), 2928–2936. <https://doi.org/10.1128/JB.182.10.2928-2936.2000>
61. Kupferschmidt K. (2016). The microbial death clock. *Science (New York, N.Y.)*, 351(6278), 1143. <https://doi.org/10.1126/science.351.6278.1143>
62. LaFramboise T. (2009). Single nucleotide polymorphism arrays: a decade of biological, computational and technological advances. *Nucleic Acids Research*, 37(13), 4181–4193. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp552>
63. Lagier, J. C., Edouard, S., Pagnier, I., Mediannikov, O., Drancourt, M., & Raoult, D. (2015). Current and past strategies for bacterial culture in clinical

microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(1), 208–236.

<https://doi.org/10.1128/CMR.00110-14>

64. Land A.D., Penno K.L., Brzezinski J.L. (2018) Identification of microorganisms isolated from counterfeit and unapproved decorative contact lenses. *J. Forensic Sci.* 63(2), 635–649

65. Lauber, C.L., Metcalf, J.L., Keepers, K. et al. (2014) Vertebrate decomposition is accelerated by soil microbes. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 4920–4929.

66. Laupland, K. B., & Valiquette, L. (2013). The changing culture of the microbiology laboratory. *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology = Journal Canadien des Maladies Infectieuses et de la Microbiologie Medicale*, 24(3), 125–128. <https://doi.org/10.1155/2013/101630>

67. 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.

68. Lax, S., Hampton-Marcell, J.T., Gibbons, S.M. et al. (2015) Forensic analysis of the microbiome of phones and shoes. *Microbiome*, 3, 21.

69. Lee, S. B., Mills, D. K., Morse, S. A., Schutzer, S. E., Budowle, B., & Keim, P. (2020). Education and training in microbial forensics. *Microbial Forensics*, 473–495. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815379-6.00032-5>

70. Lehman D. C. (2012). Forensic microbiology. *Clinical laboratory science: journal of the American Society for Medical Technology*, 25(2), 114–119.

71. Lucci, A., Campobasso, C.P., Cirnelli, A. and Lorenzini, G. (2008) A promising microbiological test for the diagnosis of drowning. *Forensic Science International*, 182 (1–3), 20–26.

72. Magne, F., Gotteland, M., Gauthier, L., Zazueta, A., Pesoa, S., Navarrete, P., & Balamurugan, R. (2020). The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients?. *Nutrients*, 12(5), 1474.
<https://doi.org/10.3390/nu12051474>
73. Matuszewski S. (2021). Post-Mortem Interval Estimation Based on Insect Evidence: Current Challenges. *Insects*, 12(4), 314.
<https://doi.org/10.3390/insects12040314>
74. Medicine Encyclopedia (2022)
<http://medicine.jrank.org/pages/2664/Polymorphisms-STRs-VNTRs-SNPs.html>
75. 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.
76. 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.
77. Metcalf J. L. (2019). Estimating the postmortem interval using microbes: Knowledge gaps and a path to technology adoption. *Forensic Science International. Genetics*, 38, 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.11.004>
78. Metzker, M. L., Mindell, D. P., Liu, X. M., Ptak, R. G., Gibbs, R. A., & Hillis, D. M. (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(22), 14292–14297. <https://doi.org/10.1073/pnas.222522599>
79. Morentin B., Suarez-Mier M.P., Aguilera B., Arrieta J., Audicana C., Fernandez-Rodriguez A. (2012) Clinicopathological features of sudden unexpected infectious death: population-based study in children and young adults. *Forensic Sci. Int.* 220(1), 80–84

80. Muhamad Rizal, N. S., Neoh, H. M., Ramli, R., A/L K Periyasamy, P. R., Hanafiah, A., Abdul Samat, M. N., Tan, T. L., Wong, K. K., Nathan, S., Chieng, S., Saw, S. H., & Khor, B. Y. (2020). Advantages and Limitations of 16S rRNA Next-Generation Sequencing for Pathogen Identification in the Diagnostic Microbiology Laboratory: Perspectives from a Middle-Income Country. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 10(10), 816. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10100816>
81. Nagasawa, S., Motani-Saitoh, H., Inoue, H. and Iwase, H. (2013) Geographic diversity of *Helicobacter pylori* in cadavers: forensic estimation of geographical origin. *Forensic Science International*, 229, 7–12.
82. National Institute of Justice (2021) <https://nij.ojp.gov/topics/articles/search-microbial-death-clock>
83. National Research Council. 2014. Science Needs for Microbial Forensics: Developing Initial International Research Priorities. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/18737>.
84. Olakanye, A.O., Thompson, T. and Komang Ralebitso-Senior, T. (2015) Soil fungal community shift evaluation as a potential cadaver decomposition indicator. *Forensic Science International*, 257, 155–159.
85. Oren, A., & Garrity, G. M. (2021). Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(10), 10.1099/ijsem.0.005056. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005056>
86. Pearce, J. L., Bettelheim, K. A., Luke, R. K., & Goldwater, P. N. (2010). Serotypes of *Escherichia coli* in sudden infant death syndrome. *Journal of Applied Microbiology*, 108(2), 731–735. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04473.x>
87. 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.

88. Persing D.H., Tenover F.C., Hayden R.T., Ieven M., Miller M.B., Nolte F.S., Tang Y.W., Belkum A.V. (ur.) (2016) *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice*, 3rd Edition. ASM Press
89. Price, E. P., M. L. Seymour, D. S. Sarovich, J. Latham, S. R. Wolken, J. Mason, G. Vincent, K. P. Drees, S. M. Beckstrom-Sternberg, A. M. Phillippy, S. Koren, R. T. Okinaka, W. K. Chung, J. M. Schupp, D. M. Wagner, R. Vipond, J. T. Foster, N. H. Bergman, J. Burans, T. Pearson, T. Brooks, and P. Keim. (2012) Molecular epidemiologic investigation of an anthrax outbreak among heroin users, Europe. *Emerging Infectious Diseases* 18:1307-1313.
90. Rasko, D. A., Worsham, P. L., Abshire, T. G., Stanley, S. T., Bannan, J. D., Wilson, M. R., Langham, R. J., Decker, R. S., Jiang, L., Read, T. D., Phillippy, A. M., Salzberg, S. L., Pop, M., Van Ert, M. N., Kenefic, L. J., Keim, P. S., Fraser-Liggett, C. M., & Ravel, J. (2011). *Bacillus anthracis* comparative genome analysis in support of the Amerithrax investigation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(12), 5027–5032.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1016657108>
91. Riedel S. (2014). The value of postmortem microbiology cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(4), 1028–1033. <https://doi.org/10.1128/JCM.03102-13>
92. Rizzatti, G., Lopetuso, L. R., Gibiino, G., Binda, C., & Gasbarrini, A. (2017). Proteobacteria: A Common Factor in Human Diseases. *BioMed research international*, 2017, 9351507. <https://doi.org/10.1155/2017/9351507>
93. Robinson J.M., Pasternak Z., Mason C.E. and Elhaik E. (2021) Forensic Applications of Microbiomics: A Review. *Front. Microbiol.* 11:608101. doi: 10.3389/fmicb.2020.608101
94. Rodriguez, A.F., Ballesteros, S., Ory, F. et al. (2005) Virological analysis in the diagnosis of sudden children death: a medico-legal approach. *Forensic Science International*, 4633, 1–7.

95. Schaudies, R. P. (2014) State of the art for autonomous detection systems using immunoassays and protein signatures. Pp. 173-196 in Institute of Medicine and National Research Council, Technologies to Enable Autonomous Detection for BioWatch: Ensuring Timely and Accurate Information for Public Health Officials: Workshop Summary. Washington, DC: The National Academies Press.
96. Schmedes, S. E., Sajantila, A., & Budowle, B. (2016). Expansion of Microbial Forensics. *Journal of clinical microbiology*, 54(8), 1964–1974.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00046-16>
97. Schmedes, S., & Budowle, B. (2019). Microbial Forensics. *Encyclopedia of Microbiology*, 134–145. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.02483-1>
98. Schürch, A. C., Arredondo-Alonso, S., Willems, R., & Goering, R. V. (2018). Whole genome sequencing options for bacterial strain typing and epidemiologic analysis based on single nucleotide polymorphism versus gene-by-gene-based approaches. *Clinical Microbiology and Infection : the Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 24(4), 350–354.
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.12.016>
99. Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P. E., Rolain, J. M., & Raoult, D. (2009). Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Infectious Diseases : an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 49(4), 543–551. <https://doi.org/10.1086/600885>
100. Sibley, C. D., Peirano, G., & Church, D. L. (2012). Molecular methods for pathogen and microbial community detection and characterization: current and potential application in diagnostic microbiology. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 12(3), 505–521. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.01.011>

101. Snitkin, E.S., Zelazny, A.M., Thomas, P.J. et al. (2012) Tracking a hospital outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with whole-genome sequencing. *Science Translational Medicine*, 4, 148ra116.
102. 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.
103. Speruda, M., Piecuch, A., Borzęcka, J., Kadej, M., & Ogórek, R. (2022). Microbial traces and their role in forensic science. *Journal of Applied Microbiology*, 132(4), 2547–2557. <https://doi.org/10.1111/jam.15426>
104. Stray-Pedersen, A., Vege, A., & Rognum, T. O. (2008). *Helicobacter pylori* antigen in stool is associated with SIDS and sudden infant deaths due to infectious disease. *Pediatric Research*, 64(4), 405–410.
<https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e31818095f7>
105. 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.
106. United States Department of Justice (2021),
<https://www.justice.gov/olp/forensic-science>
107. Van Ert, M. N., Easterday, W. R., Huynh, L. Y., Okinaka, R. T., Hugh-Jones, M. E., Ravel, J., Zanecki, S. R., Pearson, T., Simonson, T. S., U'Ren, J. M., Kachur, S. M., Leadem-Dougherty, R. R., Rhoton, S. D., Zinser, G., Farlow, J., Coker, P. R., Smith, K. L., Wang, B., Kenefic, L. J., Fraser-Liggett, C. M., ... Keim, P. (2007). Global genetic population structure of *Bacillus anthracis*. *PloS one*, 2(5), e461.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000461>
107. Wilkins, D., Leung, M. H., & Lee, P. K. (2017). Microbiota fingerprints lose individually identifying features over time. *Microbiome*, 5(1), 1.
<https://doi.org/10.1186/s40168-016-0209-7>

108. 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.

<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.05.004>

109. Wiltshire, P.E.J., Hawksworth, D.L., Webb, J.A. and Edwards, K.J. (2014) Palynology and mycology provide separate classes of probative evidence from the same forensic samples: a rape case from southern England. *Forensic Science International*, 244, 186–195.

110. Young, J.M., Weyrich, L.S., Breen, J. et al. (2015) Predicting the origin of soil evidence: high throughput eukaryote sequencing and MIR spectroscopy applied to a crime scene scenario. *Forensic Science International*, 251, 22–31.

111. Zečević D. (ur.) (2018) *Sudska medicina i deontologija*, Zagreb, Medicinska naklada

112. Zheng, L., Yu, Z., Crippen, T.L. et al. (2013) Bacteria mediate oviposition by the black soldier fly, *Hermetia illucens* (L.), (Diptera: Stratiomyidae). *Scientific Reports*, 3, 2563.

8. Životopis

Rođena sam 27.7. 1997. u Zagrebu. Osnovnu školu sam upisala u Imotskom, a završila u Varaždinu 2012. godine. U Varaždinu sam završila prirodoslovno-matematičku gimnaziju 2016. godine. Medicinski fakultet upisala sam 2016. godine na Sveučilištu u Zagrebu, čiji sam redovni student. Tijekom studija bila sam demonstrator na Katedri za patofiziologiju i Katedri za kirurgiju, te radila na trijaži Kliničke bolnice Merkur.