

**Verteilungsmuster, Entwicklungsraten und
Wirtsnachweis
nekrophager Fliegenarten an menschlichen Leichen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften
der Goethe-Universität in Frankfurt am Main

von

Victoria Christiane Bernhardt

aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main 2018

(D30)

vom Fachbereich Biowissenschaften der Goethe – Universität Frankfurt am Main als publikationsbasierte Dissertation angenommen.

Dekan:

Prof. Dr. Sven Klimpel

Institut für Ökologie, Evolution und Diversität
Integrative Parasitology and Zoophysiology
Goethe-Universität, Frankfurt am Main
Max-von-Laue-Str. 13
60438 Frankfurt am Main

Gutachter:

Prof. Dr. Jörg Oehlmann

Institut für Ökologie, Evolution und Diversität
Aquatische Ökotoxikologie
Goethe-Universität, Frankfurt am Main
Max-von-Laue-Str. 13
60438 Frankfurt am Main

Priv. Doz. Dr. Jens Amendt

Institut für Rechtsmedizin
Universitätsklinikum Frankfurt
Goethe-Universität, Frankfurt am Main
Kennedyallee 104
60596 Frankfurt am Main

Datum der Disputation:

31.08.2018

Zusammenfassung

Die forensische Entomologie nutzt nekrophage Insekten, hauptsächlich Dipteren und ihre juvenilen Stadien, zur Schätzung der minimalen Leichenliegezeit. Dem liegt zugrunde, dass nekrophage Dipteren binnen Minuten nach dem Todeseintritt potentiell in der Lage sind, einen Leichnam zu detektieren und zu besiedeln. Das anschließende Wachstum und die Entwicklung der juvenilen Stadien erfolgt als Funktion von der Art und der Umgebungstemperatur.

Mit Hilfe von Laborstudien konnten bislang für einige forensisch relevante Fliegenarten Entwicklungsdaten erhoben werden, die eine Altersbestimmung der sich an einem Leichnam entwickelnden Larven und Puppen erlauben und so eine Schätzung der minimalen Leichenliegezeit ermöglichen. Als Nährsubstrat für Laborstudien werden tierische Gewebe verwendet. Eine Übertragbarkeit der Daten auf humanes Gewebe wurde aber bislang nicht verifiziert. In der vorliegenden Arbeit wurde das larvale Wachstum und die juvenile Entwicklungsgeschwindigkeit der forensisch relevanten Schmeißfliege *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) auf humanem Muskelgewebe untersucht und mit dem Wachstum auf Schweineleber, magerem Schweinemuskelfleisch und Schweinehackfleisch verglichen. Die auf humanem Gewebe heranwachsenden Individuen waren mit bis zu 3,5 mm signifikant länger als die Individuen, die sich auf Leber und dem mageren Schweinemuskelfleisch entwickelten. Bei der Verwendung von Hackfleisch vom Schwein zeigte sich kein Unterschied. Darauf basierend wird die Empfehlung ausgesprochen, für zukünftige Entwicklungsstudien Schweinehackfleisch als Ersatz für humanes Gewebe zu verwenden.

Zahlreiche Anleitungen zur Asservierung forensisch-entomologischer Spuren empfehlen das Sammeln getrennt nach Körperregionen eines Leichnams. Dies soll eine mögliche gewebespezifische Entwicklungsrate berücksichtigen. Das für die vorliegende Arbeit durchgeführte systematische Absammeln von Fliegenlarven von 51 Leichnamen getrennt nach Körperregionen zeigte keine artspezifischen Präferenzen für bestimmte Gewebe oder Körperregionen. Das Artenspektrum

entsprach größtenteils dem aufgrund von Studien an Schweinekadavern zu erwartendem Artenspektrum für Deutschland und Mitteleuropa. Insgesamt konnten 15 Schmeißfliegenarten nachgewiesen werden, von denen in der Regel mehrere gleichzeitig an einem Leichnam zu finden waren. Dies zeigt, dass ein Faktor wie interspezifische Konkurrenz in Zukunft mehr Beachtung in der Forschung erhalten sollte.

Bislang wurde in der forensischen Entomologie die minimale Leichenliegezeit durch die Untersuchung juveniler Stadien von Fliegen eingegrenzt. Eine eventuell mögliche Ausweitung dieses Zeitfensters könnte durch eine Altersbestimmung der adulten Fliegen oder der leeren Puparien gelingen. Der Nachweis, dass die dafür untersuchten Fliegen bzw. Puparien tatsächlich von dem fraglichen Leichnam stammen, war bislang nicht möglich. Die forensische relevante Schmeißfliege *Lucilia sericata* wurde in der vorliegenden Arbeit auf humanem Gewebe und Gewebe von elf weiteren Tierarten großgezogen. Durch die Analyse stabiler Kohlen- und Stickstoffisotope konnte ein von diesen elf Tierarten abgrenzbares humanes Isotopenprofil sowohl für die adulten Fliegen von *L. sericata*, als auch für ihre leeren Puparien detektiert werden. Dieses Profil spiegelte die Nahrungszusammensetzung der Wirte wider.

Die vorliegende Arbeit erhebt Daten zur Entwicklung einer forensisch relevanten Schmeißfliegenart auf humanem Gewebe, belegt das bislang lediglich am tierischen Modell erhobene Schmeißfliegeninventar als für menschliche Leichen relevant und hinterfragt die gewebespezifische Asservierungsempfehlung als ein akademisches Artefakt. Auf dieser Basis konnten Empfehlungen für die Weiterzucht fallrelevanter entomologischer Spuren ausgesprochen werden, die gerichtsverwertbar sind und die Verwendung von tierischem Gewebe oder Tierkadaver in der forensisch-entomologischen Forschung legitimieren. Die Analyse stabiler Isotope legt darüber hinaus einen neuen, innovativen Grundstein für die routinemäßige Spurenuordnung älterer Entwicklungsstadien und ist damit Vorreiter auf dem Gebiet der forensischen Entomologie.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungen &Tabelle	I
Abkürzungen	II
Einleitung	1
Forensische Entomologie.....	3
Der Entwicklungszyklus von Fliegen und die Schätzung der Leichenliegezeit.....	4
Einflussgrößen auf die juvenile Entwicklung nekrophager Dipteren	7
Zuordnung entomologischer Spuren zu ihrer Nahrungsquelle.....	8
Stabile Isotope.....	10
Rekonstruktion der Nahrungshistorie mittels stabiler Kohlenstoff- und Stickstoffisotope.....	11
Ziel der Arbeit.....	14
Diskussion	16
Die Verwendung von Nährgeweben in forensisch-entomologischen Studien.....	17
Verteilung nekrophager Larven am menschlichen Körper.....	21
Artvorkommen nekrophager Dipteren an menschlichen Leichnamen in Deutschland	23
Methoden zur Zuordnung entomologischer Spuren zu ihrer ursprünglichen Nahrungsquelle.....	27
Fazit und Ausblick	29
Literatur	32
Anhang	46
Erklärung zu den Autoren-/Autorinnenanteilen an den einzelnen Kapiteln der Promotionsarbeit und die dazugehörigen Kapitel.....	46
Of pigs and men – comparing the development of <i>Calliphora vicina</i> (Diptera: Calliphoridae) on human and porcine tissue.....	47
Same, same but different! – matching entomological traces to a human food source by stable isotope analysis	55
Species diversity and tissue specific dispersal of necrophagous Diptera on human bodies	63
Curriculum vitae	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abbildungen

- Abb. 1: Sukzessives Auftreten verschiedener Insektenfamilien in Abhängigkeit der Verwesungsstufen eines Kadavers. Die erste Besiedlungswelle (weiss; fein gestrichelt) wird vor allem durch Schmeißfliegen verursacht. Die zweite bis vierte Besiedlungswelle (hellgrau; gestrichelt) durch Vertreter der Fleischfliegen, Echte Fliegen, Buckelfliegen und Käsefliegen. Die fünfte Besiedlungswelle wird durch verschiedene Käferarten verursacht. 3
- Abb. 2: Abfolge zeitlicher Ereignisse im Rahmen einer Todeszeitermittlung. Das PMI gibt den Zeitraum zwischen dem Todeseintritt und dem Auffinden eines Leichnams an. Das PMI_{min} ist der Zeitraum, der berechnet wird, ausgehend von einem bestimmten Entwicklungsstand eines Insekts zurück zum Zeitpunkt der ersten Insektenbesiedlung. 5
- Abb. 3: Schematische Darstellung des Unterschiedes zwischen einem „leichten“ und „schweren“ Isotops am Beispiel von Kohlenstoff. Das schwere Isotop weißt in seinem Atomkern ein zusätzliches Neutron auf gegenüber dem leichten Isotop und hat somit 13 Neutronen an der Zahl, weshalb es bei chemischen Reaktionen langsamer reagiert als das leichtere Isotop mit nur 12 Neutronen. 10
- Abb. 4: Die Anzahl forensisch-entomologischer Publikationen seit 1894 (Quelle: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>; Stand: November 2017). Die Sterne markieren einzelne Publikationen, die durch die geringe Anzahl nicht ausreichend dargestellt wurden. Seit den 1980er Jahren stieg die Anzahl an Veröffentlichungen stetig an. Seit der Gründung der European Association for Forensic Entomology (EAFE) im Jahr 2002 nahm die Bedeutung und das Interesse an der Disziplin deutlich zu. 16
- Abb. 5: Schema über den Einfluss des Nährgewebes auf die Entwicklung nekrophager Dipteren und die Folgen für die Berechnung des PMI_{min}. Die Verwendung von Leber führt zu einer zeitlichen Überschreitung des wahren PMI_{min}, während die Verwendung von Hackfleisch das PMI zeitlich unterschreitet. Die Folgen eines Überschreitens sind im Sinne des minimalen PMI allerdings gravierender als das zeitliche unterschreiten, da eine Person bei der Unterschreitung des PMI zumindest sicher tot war. 19
- Abb. 6: Mögliche Aufteilung und der Nutzen einzelner Körperteile der Fliege für Analysen zur Altersbestimmung und Zuordnung zur Nahrungsquelle mittels Pteridinfluoreszenzanalyse (Kopf), n-Pentacosan-Quantifizierung (Beine) oder Ovarienentwicklung (Abdomen) und eventueller Isotopenuntersuchungen (Flügel). 29

Tabelle

- Tabelle 1: Auszug der am häufigsten verwendeten chemischen Elemente und ihren stabilen Isotopen für die Rekonstruktion von Nahrungsnetzen in Ökosystemen (verändert nach Hobson 1999). 11

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Abs.	Absatz
ADD	accumulated degree days
ADH	accumulated degree hours
ARF	anthropological research facility
ATP	Adenosintriphosphat
CAM	crassulacean acid metabolism
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DMTS	Dimethyltrisulfid
DMDS	Dimethyldisulfid
DNA	deoxyribonucleic acid
EAFE	European Association for Forensic Entomology
et al.	et alii/aliae
ff.	folgende
GVG	Gerichtsverfassungsgesetz
mRNA	messenger-ribonucleic acid
miRNA	micro-ribonucleic acid
p.m.	post mortem
PDB	PeeDee Belemnite
PEP	Phosphoenolpyruvat
PMI	postmortales Intervall
PMI _{min}	minimales postmortales Intervall
Nr.	Nummer
RiStBV	Richtlinien für das Strafverfahren und das Bußgeldverfahren
RNA	ribonucleic acid

RuBisCO	Ribulose-1,5-biphosphat-carboxylase/-oxygenase
StGB	Strafgesetzbuch
StPO	Strafprozessordnung
STR	short tandem repeats
TSW _{min}	minimaler Temperaturschwellenwert
VOC	volatile organic compounds

Einleitung

Für die Aufklärung eines Kapitalverbrechens mit tödlichem Ausgang (z.B. § 211 StGB (Mord), § 212 StGB (Totschlag), § 227 StGB (Körperverletzung mit Todesfolge)) arbeiten verschiedene staatliche Ermittlungsbehörden und von diesen Ermittlungsbehörden unabhängige Institutionen zusammen. Dabei fungiert die Staatsanwaltschaft als sogenannte Herrin des Vorverfahrens. Die Staatsanwaltschaft klärt als zuständiges Organ im Vorverfahren den Sachverhalt auf (§§ 152 Abs. 2, 160 Abs. 1 StPO). Sie lenkt und leitet das Ermittlungsverfahren (Nr. 1 – 3 RiStBV). Mit der Sachverhaltsermittlung kann die Staatsanwaltschaft Ermittlungspersonen gemäß § 152 Abs. 1 GVG Behörden und Beamte des Polizeidienstes gemäß § 161 Abs. 1 StPO oder andere Stellen, wie z.B. rechtsmedizinische Institute, beauftragen (Nr. 3 Abs. 2 RiStBV)(Eschelbach 2013). Bei der Sachverhaltsaufklärung sollen zur Ermittlung des Täters u.a. tatrelevante Spuren an einem Fund- oder Tatort sichergestellt werden (Nahrman *et al.* 2016). Sowohl die zur Belastung als auch zur Entlastung dienenden Umstände sind zu ermitteln (§ 160 Abs. 2 StPO). Wenn Mitarbeiter/innen eines rechtsmedizinischen Institutes z.B. im Rahmen eines entomologischen Gutachtens beauftragt werden, kommt ihnen überwiegend die Rolle und Funktion eines Sachverständigen gemäß §§ 72 ff. StPO zu.

Die Feststellung der Todesursache nehmen Mitarbeiter rechtsmedizinischer Institute vor. Neben Ärzten, die den Leichnam obduzieren und somit makro- und/oder mikroskopisch die Todesursache feststellen und ggf. auch den Tatablauf rekonstruieren können, sind es vor allem Toxikologen, die die Einverleibung körperfremder Substanzen wie Drogen und Medikamente nachweisen und Biologen, die einen Leichnam über das individuelle DNA-Profil sicher identifizieren oder auch Fremd-DNA auswerten und zuordnen können (Madea, Wiegand & Mußhoff 2015). Eine häufige Frage, die sich bei einem solchen Verbrechen ergibt, ist die nach der Todeszeit (Madea 2003; Hochmeister, Grassberger & Stimpfl 2007; Dettmeyer, Schütz & Verhoff 2014).

Die Todeszeit kann auf Basis von frühen Leichenerscheinungen eingegrenzt werden. Zu den wichtigsten zählen die Totenflecke (Livores), die Totenstarre (Rigor mortis) und die Abkühlung des Körpers (Madea 2003; Hochmeister *et al.* 2007; Dettmeyer *et al.* 2014). Totenflecke entstehen nach Herz-Kreislauf-Stillstand durch das Absinken des Blutes in die von der Schwerkraft abhängigen Körperpartien. Neben dem erstmaligen Erscheinen nach ca. 45 Min. (\pm 30 Min.), werden vor allem ihre „Wegdrückbarkeit“ und „Verlagerbarkeit“ als Zeitparameter angewandt. So sind Totenflecke bis ca. 6 Stunden post mortem (p.m.) vollständig und bis ca. 12 Stunden p.m. unvollständig verlagerbar (Madea 2003).

Die Totenstarre bildet sich durch den irreversiblen Abfall der Adenosintriphosphat (ATP)-Konzentration ca. 3 bis 4 Stunden p.m. aus. Neben dem erstmaligen Eintritt sind vor allem die Zeitpunkte der vollständigen Ausprägung, der beginnenden Lösung und der vollständigen Lösung für die Ermittlung der Todeszeit maßgeblich. In Abhängigkeit der Umgebungstemperatur tritt die vollständige Lösung nach ca. 3 bis 4 Tagen p.m. ein (Madea 2003).

Der Abfall der Körperkerntemperatur und die Angleichung an die Umgebungstemperatur folgen einem gleich bleibenden Schema. Nach einer anfänglichen Plateauphase von ca. 2 bis 3 Stunden fällt die Temperatur in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur, der Lagerung, der Bekleidung, der Witterung und der Körperproportionen um ca. 0,5 bis 1,5 °C pro Stunde ab. Eine Hilfe bei der Einbeziehung externer Faktoren wie z.B. der Kleidung bietet das Nomogramm nach Henßge, welches einen empirisch ermittelten Korrekturfaktor miteinbezieht (Dettmeyer *et al.* 2014).

Durch den fortschreitenden biologischen Zerfall, wie Autolyse und Fäulnis, beschränkt sich die Anwendbarkeit dieser Methoden auf die ersten ca. 72 Stunden p.m.. Aufgrund eines erst späteren Auffindens des Leichnams kann die Anwendbarkeit dieser Methoden nicht mehr zuverlässig gewährleistet werden (Madea 2003; Hochmeister *et al.* 2007; Dettmeyer *et al.* 2014). Eine mögliche Lösung in solchen Fällen bietet die Begutachtung der mit dem Leichnam assoziierten

nekrophagen Insekten und ihrer juvenilen Stadien (Greenberg 1991; Greenberg & Kunich 2002; Amendt *et al.* 2011).

Forensische Entomologie

Mit fortschreitender Verwesung des Leichnams verändert sich nicht nur die Textur des Gewebes von faulig erweicht bis ledrig vertrocknet/mumifiziert und damit einhergehend die olfaktorischen Komponenten, sondern auch die Artzusammensetzung der (nekrophagen) Insektenfauna (Wang *et al.* 2017).

Die klassischen Erstbesiedler am Leichnam sind Schmeißfliegen (Diptera: Calliphoridae), die das noch frische Verwesungsstadium bevorzugen und typischerweise die erste Besiedlungswelle darstellen. Etwas zeitlich versetzt, mit beginnender Blähung des Körpers, können weitere nekrophage Fliegenarten auftreten, deren Larven teilweise auch räuberisches Verhalten zeigen. Zu diesen Arten zählen Vertreter der Fleischfliegen (Diptera: Sarcophagidae), der Echten Fliegen (Diptera: Muscidae), der Buckelfliegen (Diptera: Phoridae) und der Käsefliegen (Diptera: Piophilidae). Neben den verschiedenen Fliegenarten können auch adulte Käfer und ihre Larven am Leichnam vorkommen. Durch ihre stark ausgeprägten

Mundwerkzeuge ist es ihnen möglich, auch vertrocknetes Gewebe zu zersetzen. Als wichtige Vertreter sind hier Speckkäfer (Coleoptera: Dermestidae) und Aaskäfer (Coleoptera: Silphidae) zu nennen (Abb. 1).

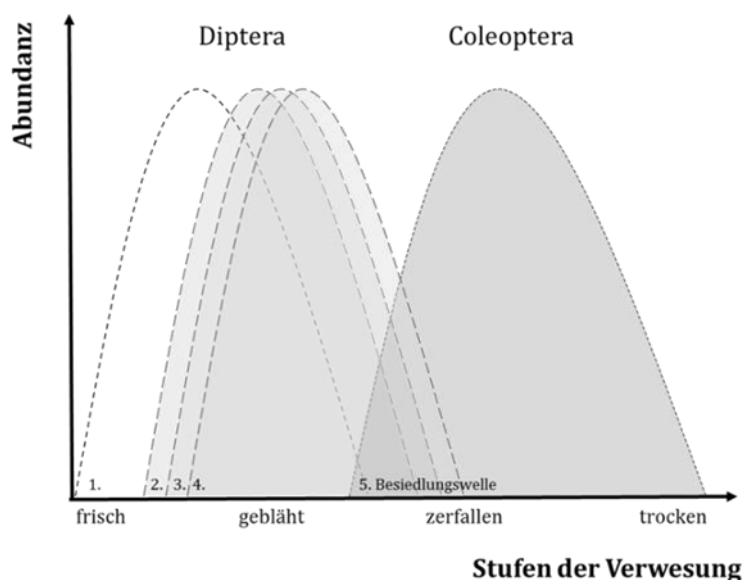


Abb. 1: Sukzessives Auftreten verschiedener Insektenfamilien in Abhängigkeit der Verwesungsstufen eines Kadavers. Die erste Besiedlungswelle (weiss; fein gestrichelt) wird vor allem durch Schmeißfliegen verursacht. Die zweite bis vierte Besiedlungswelle (hellgrau; gestrichelt) durch Vertreter der Fleischfliegen, Echte Fliegen, Buckelfliegen und Käsefliegen. Die fünfte Besiedlungswelle wird durch verschiedene Käferarten verursacht.

Zusätzlich zu den nekrophagen Arten können unabhängig vom Verwesungszustand auch omnivore und adventive Arten, wie Wespen, Ameisen und Spinnentiere gelegentlich am Leichnam vorzufinden sein. Sie ernähren sich nicht zwangsläufig direkt vom Leichnam, sondern erbeuten beispielsweise Larven, die sich am Leichnam entwickeln (Payne 1965; Smith 1986; Matuszewski *et al.* 2008).

Der Entwicklungszyklus von Fliegen und die Schätzung der Leichenliegezeit

Binnen weniger Minuten nach dem Todeseintritt können weibliche Fliegen, zumeist Schmeißfliegen (Diptera: Calliphoridae), einen Leichnam bzw. Aas im Allgemeinen aufgrund olfaktorischer Stimuli, wie flüchtige organische (Schwefel-)Verbindungen, detektieren (Amendt *et al.* 2011; Forbes & Perrault 2014). Die eigentliche Besiedlung erfolgt durch das Ablegen ihrer Eier in die natürlichen Körperöffnungen des Gesichts, der Anal-Genital-Region oder auch in offene Wunden. Aus den Eiern schlüpfen Larven, die daraufhin anfangen, sich am Aas oder Leichnam zu entwickeln und zu fressen. Die Larven durchleben insgesamt drei Larvenstadien, die jeweils durch eine Häutung voneinander abgegrenzt werden. Am Ende des dritten Larvenstadiums beginnen die Larven aktiv ihre Nahrungsquelle zu verlassen, um sich einen geeigneten Ort für die Verpuppung zu suchen. Dieses Stadium wird auch als „*post-feeding-Stage*“ bezeichnet. Während der Puppenphase, die im Allgemeinen circa die gleiche Zeitdauer wie die larvale Phase einnimmt, findet die Metamorphose zur adulten Fliege statt. Mit dem Schlüpfen der adulten Fliege ist ein Entwicklungszyklus durchlaufen und beendet (Amendt 2007).

Die Dauer solcher Entwicklungszyklen ist hauptsächlich artspezifisch und temperaturabhängig, da Insekten ektotherme Tiere sind und physiologische und enzymatische Prozesse, die für die Entwicklung und das Wachstum benötigt werden, von der Umgebungstemperatur abhängig sind (Grassberger & Reiter 2001; Donovan *et al.* 2006). Zusätzlich weist jede Art gemäß ihrer ökologischen Potenz einen spezifischen Toleranzbereich für verschiedene Umweltfaktoren, wie Temperatur auf, in dem sie sich entwickeln und überleben kann. Neben einem oberen, maximalen

Temperaturschwellenwert und einem optimalen Temperaturbereich (Wardle 1930; Aubernon *et al.* 2016), ist vor allem der untere, minimale Temperaturschwellenwert (TSW_{\min}) für die Entwicklungsgeschwindigkeit maßgeblich, aber auch für das Artvorkommen in Abhängigkeit der geographischen Lage und der Jahreszeit. So benötigt jede Art eine Mindesttemperatur, um existieren und ihre Entwicklung abschließen zu können. Jedoch gibt es auch für einzelne Entwicklungsabschnitte, wie die larvale Phase und die Puppenphase, unterschiedlich hohe TSW_{\min} (Richards, Crous & Villet 2009; Bernhardt *et al.* 2016).

Durch die Kenntnis von Art und Umgebungstemperatur kann mit Hilfe von Entwicklungsdaten, die aus Laborversuchen und -daten resultieren, das Alter der Tiere geschätzt werden, unter der Annahme, dass jede Art eine gleichbleibende Entwicklungsgeschwindigkeit für unterschiedlich hohe Temperaturen aufweist (Marchenko 2001; Grassberger, Friedrich & Reiter 2003; Warren & Anderson 2013). Basierend auf dem Wissen von Art, Temperatur und Entwicklungsgeschwindigkeit und der Annahme, dass ein Leichnam nach dem Todeseintritt zeitnah durch Fliegen besiedelt wird, kann durch das Alter der Tiere die minimale Leichenliegezeit eingegrenzt werden.

Die minimale Leichenliegezeit im Kontext forensisch entomologischer Untersuchungen wird durch das Schätzen des sogenannten *minimalen* postmortalen Intervalls (PMI_{\min}) ermittelt. Während das postmortale Intervall (PMI) durch den Zeitpunkt des Todeseintritts und dem Zeitpunkt des Auffindens des Leichnams definiert ist, ist das PMI_{\min} als Zeitraum zwischen der ersten Insektenbesiedlung, im Sinne einer Eiablage, und dem Erreichen einer bestimmten Entwicklungslandmarke, wie z.B. dem Zeitpunkt der ersten Verpuppung oder des ersten Schlüpfens adulter Fliegen definiert (Villet & Amendt 2011; Amendt *et al.* 2011). Da die Insektenbesiedlung eines Leichnams durch verschiedene Faktoren, wie z.B. durch eine verschlossene Wohnung ohne direkte Zugangsmöglichkeit für Insekten, Verpackung des Leichnams oder ungünstige Wetterverhältnisse verzögert werden kann, ist der Zeitpunkt der Insektenbesiedlung nicht gleichzusetzen mit dem Todeszeitpunkt, weshalb das PMI_{\min} lediglich den Zeitraum angeben kann, seit wann

ein Mensch *mindestens* tot ist (Amendt, Krettek & Zehner 2004; Tomberlin *et al.* 2011)(Abb. 2).

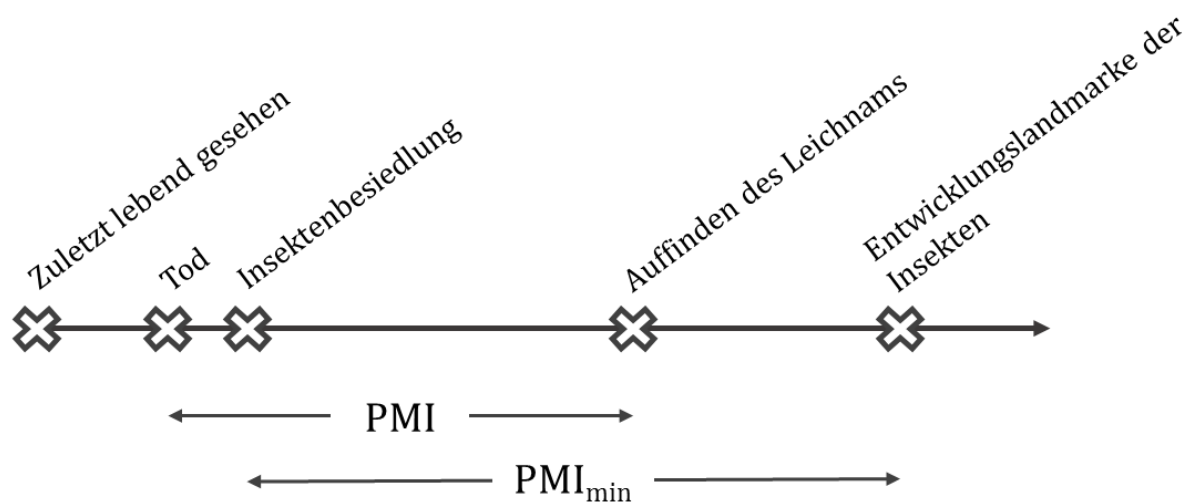


Abb. 2: Abfolge zeitlicher Ereignisse im Rahmen einer Todeszeitermittlung. Das PMI gibt den Zeitraum zwischen dem Todeseintritt und dem Auffinden eines Leichnams an. Das PMI_{min} ist der Zeitraum, der berechnet wird, ausgehend von einem bestimmten Entwicklungsstand eines Insekts zurück zum Zeitpunkt der ersten Insektenbesiedlung.

Für die Schätzung des PMI_{min} können unterschiedliche Methoden angewandt werden, die auf den bereits erwähnten Entwicklungsdaten basieren. Für die Schätzung des larvalen Alters bietet sich an, nach einer mittels morphologischer Charakteristika oder molekularer Techniken, wie dem DNA-Barcoding (Folmer *et al.* 1994; Szpila 2012) erfolgten Artbestimmung, die Länge der Larven zu messen. Das Alter der Larven kann anschließend bei Kenntnis bei der Entwicklung zugrundeliegenden Temperaturbedingungen mit Hilfe von Wachstumskurven oder sogenannter Isomegalen-Diagramme abgelesen werden (Grassberger & Reiter 2001, 2002). Andere Methoden beruhen auf der juvenilen Entwicklungsdauer bis zum Erreichen definierter Entwicklungsabschnitte, wie der ersten oder zweiten Häutung, der ersten Verpuppung oder dem Schlüpfen der adulten Fliegen. Hierfür bietet sich die Möglichkeit an, das Alter mit Hilfe eines Isomorphen-Diagramms zu ermitteln (Grassberger & Reiter 2001, 2002) oder das Alter mittels akkumulierter Tages- oder Stundengrade (engl. **accumulated degree days/hours**; ADD/H) zu berechnen:

$$\text{Alter [Tage/Stunden]} = \frac{ADD/H}{(\text{Umgebungstemperatur} - TSW_{min})}$$

Für letztere Methode ist die Kenntnis über die ADD/H und den TSW_{\min} nötig. Beide Werte wurden für diverse forensisch relevante Fliegenarten bereits empirisch im Labor erhoben (Marchenko 2001). Die Idee der ADD- oder ADH-Methode basiert auf der Annahme, dass die Entwicklungsrate in einem direkten linearen Zusammenhang mit der Umgebungstemperatur steht und dass zum Erlangen bestimmter Entwicklungsabschnitte (Verpuppung/Schlüpfen der Fliege) eine gleichbleibende Menge Temperaturgrade benötigt werden, die innerhalb einer Art gleich sind (Amendt *et al.* 2007, 2011; Gunn 2009). Die Entwicklungsgeschwindigkeit wird demnach als thermale Zeiteinheit gemessen.

Einflussgrößen auf die juvenile Entwicklung nekrophager Dipteren

Neben den beiden Hauptfaktoren, die die Entwicklungsdauer beeinflussen, Artzugehörigkeit und Umgebungstemperatur, gibt es weitere signifikante Variablen, welche die das Wachstum juveniler Dipteren beeinflussen können (Wardle 1930). Neben biotischer Faktoren, wie intra- und interspezifischer Konkurrenz oder Prädationsdruck, sind es vor allem abiotische Faktoren, wie durch Madenmassen generierte Wärme, Licht, Luftfeuchtigkeit, Medikamente/Drogen oder das Nahrungsgewebe, welche das Larvenwachstum und die Dauer eines Entwicklungszyklus beeinflussen können (Wardle 1930; Villet & Amendt 2011). Solche phänotypischen Anpassungen eines Genotyps an Umweltverhältnisse wird allgemein unter dem Begriff „*phänotypische Plastizität*“ zusammengefasst und sichert u.a. das Überleben einer Art (Agrawal 2001; Whitman & Agrawal 2009). Das Phänomen der phänotypischen Plastizität bringt aus biologischer Sicht große Vorteile für die jeweiligen Lebewesen – aus forensischer Perspektive ist der Umgang mit phänotypischer Plastizität mühsam, da die einzelnen Einflussfaktoren erkannt und untersucht werden müssen.

Um zu verstehen, wie solche Einflussgrößen auf einen toten Körper und die damit verbundene Insektenfauna wirken, werden in den allermeisten Fällen Tierkadaver von z.B. Schweinen, Hunden, Kaninchen, Mäusen oder Vögeln (Reed 1958; Payne

1965; Smith & Wall 1997; Matuszewski *et al.* 2008; Wang *et al.* 2017) für Untersuchungen herangezogen. Während es für manche Fragestellungen sinnvoll erscheint, einen Tierkadaver *in toto* zu verwenden (Shahid *et al.* 2003; Grassberger & Frank 2004; Szpila *et al.* 2015), wie z.B. bei Sukzessionsstudien, da, je nach Tier, eine zum Menschen vergleichbare Biomasse aufgebracht wird, genügt es für andere (Labor-) Untersuchungen, einzelne Organe oder Gewebe von Tieren zu nutzen, die stellvertretend für humanes Gewebe verwendet werden. Die Vielfalt der in Laborversuchen Verwendung findender Tierarten und Darreichungsformen zeigt sich bei larvalen Wachstumsstudien, für die Leber vom Schwein, Rind, Huhn oder Schaf verwendet wurde, sowie mageres oder durchwachsendes Muskelfleisch - gekocht oder roh - und auch Hackfleisch, letzteres auch teilweise als Mischung mehrerer Arten, kam zur Anwendung (Byrd & Allen 2001; Grassberger *et al.* 2003; Disney 2005; Nabity, Higley & Heng-Moss 2006; Donovan *et al.* 2006; Richards, Paterson & Villet 2008; Niederegger, Pastushek & Mall 2010).

Studien, die den Effekt unterschiedlicher Nährgewebe innerhalb einer Tierart aber auch zwischen verschiedenen Tierarten in Hinblick auf das Larvenwachstum untersuchten, zeigten, dass zwischen verschiedenen Gewebetypen, wie z.B. Leber und Muskel, aber auch zwischen einzelnen Tierarten, wie z.B. Schwein und Rind, signifikante Wachstums- und Entwicklungsunterschiede auftreten können (Kaneshrajah & Turner 2004; Clark, Evans & Wall 2006; Day & Wallman 2006; Ireland & Turner 2006; El-Moaty & Kheirallah 2013). Die Autoren dieser Studien empfehlen daher, die Körperregion oder Gewebeart, von der die Fliegenlarven bei der entomologischen Spurensicherung sichergestellt wurden, zu notieren und bei der Schätzung des PMI_{min} zu berücksichtigen.

Zuordnung entomologischer Spuren zu ihrer Nahrungsquelle

Die Zuordnung älterer Entwicklungsstadien, wie post-feeding Larven, Puppen, adulter Fliegen und ihrer korrespondierenden leeren Puparien, zu ihrer ursprünglichen Nahrungsquelle bzw. zu einem Leichnam stellt im Rahmen der Qualitätssicherung während der forensisch entomologischen Begutachtung eine

Herausforderung dar, da diese Stadien sich nicht (mehr) im unmittelbaren Kontakt zum Leichnam befinden und sich daher auch nicht zweifelsfrei einem Leichnam zuordnen lassen. Je nach Auffindsituation ist es denkbar, dass sich diese Stadien beispielsweise an einem anderen Tierkadaver entwickelt haben könnten und daher im forensischen Kontext eine Kontamination des Fundortes darstellen.

Während Larven, die sich bereits in ihrer Abwanderungsphase befinden, durch einen DNA-Nachweis und ggf. sogar ein STR-Profil ihrer Nahrungsquelle zuordnen lassen können, indem der Speisebrei, der sich im Kropf oder Darm der Tiere befindet extrahiert wird (Wells *et al.* 2001; Zehner, Amendt & Krettek 2004; Li *et al.* 2007; de Lourdes Chávez-Briones *et al.* 2013), ist diese Methode schon bei Puppen kaum mehr durchführbar, da die gesamte Nahrung bereits verdaut wurde. Die Zuordnung von Puppen zu ihrer Nahrungsquelle kann insbesondere dann von Bedeutung sein bzw. in Frage gestellt werden, wenn zusätzlich zum Leichnam auch ein Haustierkadaver in der Wohnung aufgefunden wird (Sanford 2015) oder anderweitige Speise- oder Fleischreste in größerem Umfang vorkommen. In Kontext von Fundorten im Freiland kann das Argument angebracht werden, dass die älteren Entwicklungsstadien von einem Wildtierkadaver stammen könnten, der unbestimmte Zeit zuvor oder zeitgleich am aktuellen Leichenfundort verweste.

Eine Zuordnung besonders der adulten Stadien und leeren Puparien zum Leichnam ist aber nicht nur aus Gründen der forensischen Qualitätssicherung von Bedeutung. Seit jüngerer Zeit ist die Altersbestimmung adulter Fliegen und die zeitabhängige Verwitterung ihrer leeren Puparien in den Fokus der Forschung gerückt, da mit Hilfe dieser Informationen das Zeitfenster für die Schätzung des PMI_{min} ausgedehnt werden könnte (Zhu *et al.* 2007, 2013, 2017; Pechal *et al.* 2014; Bernhardt *et al.* 2017a; b). Eine Studie von Marchetti *et al.* (2013) deutet darauf hin, dass es möglich ist, menschliche DNA aus leeren Puparien zu extrahieren und sie daher mit einem Leichnam verknüpfen zu können. Doch stammen diese Ergebnisse aus einer Fallstudie und nicht aus einem wissenschaftlichen Versuchsaufbau, so dass eine externe Kontamination mit Blut beispielsweise nicht ausgeschlossen werden kann.

Für adulte Fliegen gab es bislang keine methodischen Ansätze, um eine Zuordnung zu gewährleisten.

Nach bisherigem Kenntnisstand gibt es demnach keine gesicherten Methoden, um erwachsene Fliegen bzw. leere Puparien ihrer ursprünglichen Nahrungsquelle zuzuordnen bzw. eine menschliche Leiche als Nahrungsquelle auszuschließen.

Stabile Isotope

Als Isotope werden die verschiedenen Arten eines chemischen Elements bezeichnet, die zwar gleiche chemische Eigenschaften aufweisen, sich aber in der Anzahl von Neutronen im Atomkern unterscheiden

(Fry 2006; Ben-David & Flaherty 2012; Hyodo 2015)(Abb. 3).

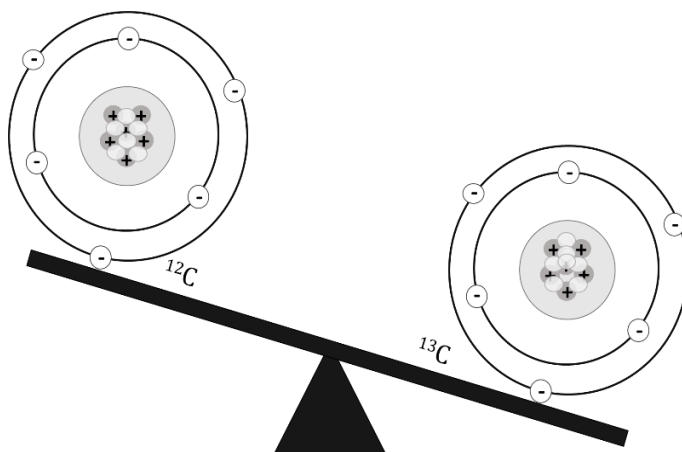


Abb. 3: Schematische Darstellung des Unterschiedes zwischen einem „leichten“ und „schweren“ Isotops am Beispiel von Kohlenstoff. Das schwere Isotop weist in seinem Atomkern ein zusätzliches Neutron auf gegenüber dem leichten Isotop und hat somit 13 Neutronen an der Zahl, weshalb es bei chemischen Reaktionen langsamer reagiert als das leichtere Isotop mit nur 12 Neutronen.

Innerhalb einer Gruppe von Isotopen kann ferner in stabile und radioaktive bzw. radiogene Isotope unterschieden werden (Meier-Augenstein 2010). Radioaktive Isotope zeigen nach einer elementspezifischen Halbwertszeit einen radioaktiven Zerfall und es entsteht ein radiogenes Isotop (Fry 2006). So zerfällt ^{87}Rb nach etwa 48.8×10^9 Jahren zu ^{87}Sr und kann dadurch beispielsweise zur Altersbestimmung von Gesteinen herangezogen werden, ähnlich der bekannten ^{14}C -Methode (Broecker & Kulp 1956; Long 1998).

Stabile Isotope hingegen zeigen keinen Zerfall. Je nach Element kommen in der Natur zwei bis vier solcher stabilen Isotope pro Element vor (Hobson 1999)(Tabelle 1). Isotope, die mehr Neutronen aufweisen als das Isotop mit der geringeren Neutronenanzahl, werden auch als *schwere* Isotope bezeichnet und weisen in der Regel auch eine langsamere Reaktionsrate auf. Isotope mit der geringeren

Neutronenanzahl werden auch als *leichte* Isotope bezeichnet und reagieren in der Regel schneller als die schweren Isotope (Schoeninger 1995; Fry 2006)(Abb. 3).

Tabelle 1: Auszug der am häufigsten verwendeten chemischen Elemente und ihren stabilen Isotopen für die Rekonstruktion von Nahrungsnetzen in Ökosystemen (verändert nach Hobson 1999).

Element	Isotope	natürliches Vorkommen (%)	Isotopenverhältnisse
Wasserstoff (H)	^1H	99,98	$^2\text{H}/^1\text{H}$
	^2H	0,02	
Kohlenstoff (C)	^{12}C	98,89	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$
	^{13}C	1,11	
Stickstoff (N)	^{14}N	99,63	$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$
	^{15}N	0,37	
Sauerstoff (O)	^{16}O	99,76	$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$
	^{17}O	0,04	
	^{18}O	0,2	
Schwefel (S)	^{32}S	95,02	$^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$
	^{33}S	0,76	
	^{34}S	4,21	
	^{36}S	0,01	

Rekonstruktion der Nahrungshistorie mittels stabiler Kohlenstoff- und Stickstoffisotope

Die Analyse von stabilen Kohlenstoff und Stickstoff Isotopen ($\delta^{13}\text{C}$ und $\delta^{15}\text{N}$) ist eine etablierte Methode zur Untersuchung von Nahrungsnetzen in Biozöosen (Crawford, McDonald & Bearhop 2008; Phillips *et al.* 2014; Hopkins & Kurlle 2016). Während der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert Auskunft über die Pflanzenarten gibt, die bevorzugt konsumiert werden (C_3 -, C_4 - und/oder Crassulaceen-Säuremetabolismus-Pflanzen (engl. *crassulacean acid metabolism*; CAM), gibt der $\delta^{15}\text{N}$ -Wert Auskunft über die trophische Ebene in einem Ökosystem (DeNiro & Epstein 1978, 1981; Peterson & Fry 1987; Meier-Augenstein 2010; Ohkouchi *et al.* 2015).

Der Kohlenstoffwert, der durch das Verhältnis von $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ zu einem internationalen Standard (PeeDee Belemnite; PDB) gebildet wird, wird als $\delta^{13}\text{C}$ -Wert [‰] dargestellt und liegt zwischen -22 bis -30 ‰ für Konsumenten von C_3 -Pflanzen und zwischen -10 bis -21 ‰ für Konsumenten von C_4 - und CAM-Pflanzen (DeNiro & Epstein 1978; Schoeninger 2014). Die unterschiedlichen Isotopenkonstellationen basieren auf den jeweiligen Photosynthesewegen der Pflanzen. Für terrestrische Pflanzen ist das CO_2 aus der Atmosphäre die Hauptquelle für Kohlenstoff und setzt sich zu 98,9 % aus ^{12}C und zu 1,1 % aus ^{13}C zusammen (Hobson 1999). C_3 -Pflanzen fixieren CO_2 im Rahmen des Calvin-Zyklus über das Enzym Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase (RuBisCO) und es werden zwei Moleküle 3-Phosphoglycerat gebildet, die jeweils einen Molekülkörper aus drei Kohlenstoffatomen bilden und daher namensgebend für die C_3 -Pflanzen sind. Die CO_2 -Fixierung bei C_4 und CAM-Pflanzen erfolgt über das Enzym Phosphoenolpyruvatcarboxylase (PEP-Carboxylase), welches Oxalacetat bildet; ein Molekülkörper aus vier Kohlenstoffatomen, welches daher namensgebend für C_4 -Pflanzen ist. Die PEP-Carboxylase dient in C_4 - und CAM-Pflanzen zur CO_2 -Vorfizierung, da die endgültige CO_2 -Fixierung ebenfalls im Rahmen des Calvin-Zyklus stattfindet. Der Unterschied zwischen C_4 - und CAM-Pflanzen ist die räumliche bzw. zeitliche Trennung dieser CO_2 -Vorfizierung. Während sie bei C_4 -Pflanzen in den Mesophyllzellen stattfindet und der nachgeschaltete Calvin-Zyklus

in den Bündelscheidenzellen, ist bei CAM-Pflanzen der Mechanismus zeitlich nach einem Tag-Nacht-Zyklus voneinander getrennt (Kadereit *et al.* 2014).

Da das Enzym RuBisCO stärker gegen das schwerere ^{13}C -Isotop diskriminiert als die PEP-Carboxylase, haben C_4 - und CAM-Pflanzen einen höheren Anteil am ^{13}C -Isotop als C_3 -Pflanzen (Schoeninger 1995; Fry 2006; Kadereit *et al.* 2014).

Die Kohlenstoffwerte von Tieren spiegeln sich primär durch ihre Ernährung und damit verbundener Pflanzenaufnahme wider, aber auch indirekt durch den Konsum von anderen Tieren bzw. deren Fleisch mit jeweils eigenen Kohlenstoffwerten.

Der Stickstoffwert wird als $\delta^{15}\text{N}$ -Wert [‰] dargestellt und ergibt sich aus dem Verhältnis von $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ zu einem internationalen Standard (Atmosphärischer Stickstoff; AIR). Der Hauptstickstoffspeicher, die Atmosphäre, setzt sich zu 99,6 % aus dem ^{14}N -Isotop und zu 0,4 % aus dem ^{15}N -Isotop zusammen (Hobson 1999). Die Fixierung und Reduzierung von anorganischem N_2 aus der Atmosphäre zu biologisch verfügbaren organischen Stickstoffverbindungen, wie Ammoniak oder Ammonium, kann beispielsweise durch Rhizobien, die in Symbiose mit Wurzeln von Leguminosen leben, erfolgen (Franche, Lindström & Elmerich 2009). Pflanzen, die den biologisch verfügbaren Stickstoff des Bodens aufnehmen, neigen dazu, das schwerere ^{15}N im Vergleich zur Atmosphäre anzureichern. Auch die Stickstoffwerte tierischer Gewebe sind positiv mit den Stickstoffwerten ihrer Nahrung korreliert und zeigen eine durchschnittliche Anreicherung von + 3,0 ‰ entlang der Nahrungskette bzw. mit steigender Trophiestufe (Minagawa & Wada 1984; Ambrose 1991; Eggers & Jones 2000). Das kommt dadurch zustande, dass Proteine mit dem leichten ^{14}N -Isotop während des Stoffwechsels schneller zugrunde gehen und ausgeschieden werden, als Proteine mit dem schweren ^{15}N (Schoeninger 1995). Als Konsequenz wird das ^{15}N -Isotop im Organismus und mit jeder weiteren Trophiestufe angereichert und stellt daher ein gutes Werkzeug zur Bestimmung der trophischen Ebene von Tieren und Menschen innerhalb eines Ökosystems dar (DeNiro & Epstein 1981; Schoeninger 1995).

Die Isotopenmethode wurde bereits für diverse Arthropoden und Insektenfamilien zur Beantwortung ökologischer Fragestellungen herangezogen (Markow, Anwar &

Pfeiler 2000; Tibbets, Wheelless & Del Rio 2008; Bennett & Hobson 2009; Perkins *et al.* 2014; Hyodo 2015). Heinrich *et al.* (2012) waren die ersten, die diese Methode erstmals auf eine forensisch relevante Fliegenart, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), anwandten. Sie untersuchten die Nahrungsquelle adulter Fliegen im Rahmen einer Laborstudie mittels stabiler Isotopen, um herauszufinden, ob die Ursprünge einer Fliegenplage nachzuverfolgen sind. Hierzu untersuchten sie fleischfreien Hausmüll, Tiermist von Huhn und Rind, sowie „Standardlaborfutter“ bestehend aus Kleie, Grasmehl, Hefe, Malz und Milchpulver, welches teilweise auch mit Maisöl angereichert wurde. Ihre Ergebnisse sind vielversprechend, da die adulten Fliegen die Isotopenwerte ihrer Nahrungsquelle widerspiegeln und eine Zuordnung zu ihren Ursprüngen möglich war.

Ziel der Arbeit

Die Verwendung menschlicher Leichname oder humaner Gewebe in Kontext forensisch entomologischer Untersuchungen und Fragestellungen ist weltweit selten und nicht unumstritten. Die Notwendigkeit dazu ergibt sich jedoch aus publizierten Forschungsergebnissen, die die Grenzen von den bislang durchgeführten Versuchen an Tierkadavern und ihren Geweben aufzeigen.

I. Entwicklungsraten juveniler Fliegen an humanem Gewebe und Artenverteilung forensisch relevanter Dipteren an menschlichen Leichnamen

Laborversuche mit Tiergeweben sowie Freilandversuche mit Tierkadavern sind „state of the art“ für Untersuchungen zur Ökologie und dem Wachstum nekrophager Fliegenarten. Eine systematische Überprüfung des Vorkommens des in Studien mit Tierkadavern nachgewiesenen nekrophagen Fliegenarten auf menschlichen Leichen und ihrer dortigen gewebespezifischen Verteilung hat bislang kaum bzw. gar nicht stattgefunden, ebenso fehlen bislang Daten zur Übertragung von Wachstumsstudien auf non-humanem Gewebe auf einen forensischen Kontext, in dem sich Fliegenlarven auf einem menschlichen Leichnam entwickeln. Statt, ausgehend von den Gegebenheiten am menschlichen Leichnam,

Entwicklungsstudien mit spezifischen Geweben zu planen und somit bisher vorliegende Erkenntnisse zu bestätigen oder zu verwerfen, wurden bislang auf Laborstudien basierende Empfehlungen ausgesprochen, die am Leichnam nur schwerlich zu realisieren sind, wie z.B. die vage Aufforderung, das Gewebe oder die Körperregion, an der Larven abgesammelt wurden, bei der Schätzung des PMI_{min} „zu berücksichtigen“. Die vorliegende Arbeit hat deshalb das Ziel, die Insektenbesiedlung am Leichnam bezüglich einer Gewebespezifität systematisch zu untersuchen und darüber hinaus erstmals die Entwicklung der juvenilen Stadien forensisch relevanter Fliegen auf humanen und porcinen Geweben miteinander zu vergleichen, um die Eignung dieses Nährmediums für das Erstellen realistischer Wachstumskurven zu bestätigen.

II. Zuordnung adulter Fliegen und leerer Puparien zu ihrer ursprünglichen Nahrungsquelle mit Hilfe stabiler Isotope

Für die Anwendung der Methoden zur Altersbestimmung von Puppen, adulter Fliegen und ihrer leeren Puparien ergibt sich die Notwendigkeit, diese Stadien einem menschlichen Leichnam bzw. ihrer ursprünglichen Nahrungsquelle zuordnen zu können, da *de facto* nur das fressende Larvenstadium einen offensichtlichen und belegbaren direkten Kontakt zum Leichnam oder Tierkadaver hat. Die vorliegende Arbeit untersuchte diesbezüglich stabile Kohlenstoff- und Stickstoffisotope in adulten Fliegen und leeren Puparien mit dem Ziel, diese ihrer ursprünglichen Nahrungsquelle wenn möglich auf Artniveau zuordnen zu können.

Diskussion

Der Nutzwert nekrophager Insekten bei der Beantwortung forensischer Fragestellungen ist bereits seit dem Ende des 19. Jahrhundert bekannt (Mégnin 1894). Allerdings stieg die Popularität dieser Disziplin, gemessen an erschienenen Veröffentlichungen, erst seit den 1960er Jahren langsam an (Lothe 1964; Nuorteva, Isokoski & Laiho 1967; Easton & Smith 1970; Evrard, Buxton & Erikson 1976) als erste Fallberichte publiziert und mit dem Erfolg der Methode geworben wurde. Aus diesem Grund ist es umso bemerkenswerter, dass es, mit wenigen Ausnahmen (Reiter 1984; Smith 1986; Greenberg & Tantawi 1993) bis zu den frühen 2000er Jahren dauerte, bis in größerem Umfang systematisch die Entwicklung forensisch relevanter Fliegenarten untersucht und in Form von Entwicklungsstudien veröffentlicht wurden (Auszug: Byrd & Allen 2001; Marchenko 2001; Grassberger & Reiter 2001; Ames & Turner 2003; Donovan *et al.* 2006). Im Zuge dieses Fortschritts wurde im Jahr 2002 die *European Association for Forensic Entomology* (EAFE) gegründet, die durch ihre assoziierten Mitglieder aus anderen Kontinenten zu einer der bedeutendsten Vereinigungen forensischer Entomologen weltweit gewachsen ist. Ziel der Verbindung ist gemäß ihrer Satzung die Entwicklung der forensischen Entomologie in Europa und die Förderung der internationalen Zusammenarbeit auf diesem Gebiet. Der wissenschaftliche Fortschritt auf diesem



Abb. 4: Die Anzahl forensisch-entomologischer Publikationen seit 1894 (Quelle: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>; Stand: November 2017). Die Sterne markieren einzelne Publikationen, die durch die geringe Anzahl nicht ausreichend dargestellt wurden. Seit den 1980er Jahren stieg die Anzahl an Veröffentlichungen stetig an. Seit der Gründung der European Association for Forensic Entomology (EAFE) (Pfeil) im Jahr 2002 nahm die Bedeutung und das Interesse an der Disziplin deutlich zu.

Gebiet ist seit dieser Zeit durch die steigende Anzahl an Publikationen merklich gewachsen (Abb. 4).

Trotz der quantitativen Zunahme wissenschaftlicher Publikationen bleiben nach wie vor viele Fragen unbeantwortet bzw. ergeben sich aus neuen wissenschaftlichen Erkenntnissen stetig neue Forschungsansätze. Ein übergeordnetes Ziel sollte jedoch die Vereinheitlichung und Transparenz der forensisch-entomologischen Methoden sein, um die Vergleichbarkeit wissenschaftlicher Erkenntnisse sicherzustellen, auf deren Basis Gutachten angefertigt werden, die vor Gericht beweiskräftig sind (Amendt *et al.* 2007; Tomberlin *et al.* 2011; Gaudry & Dourel 2013).

Die Verwendung von Nährgeweben in forensisch-entomologischen Studien

Für die Schätzung des PMI_{min} werden Entwicklungsdaten nekrophager Fliegenarten herangezogen, die im Labor unter konstanten Bedingungen erhoben wurden. In diesen Studien wurde bislang vor allem Wert auf eine ausreichende hohe Anzahl untersuchter Temperaturen gelegt (Byrd & Allen 2001; Richards *et al.* 2013; Wang *et al.* 2016). Ein Aspekt, der in diesem Zusammenhang bislang vernachlässigt wurde, ist ein einheitliches Nährgewebe. Eine Vielzahl von Studien hat in den letzten Jahren belegt, dass Larven ein gewebespezifisches Wachstum zeigen, welches zu teils signifikanten Wachstums- und Entwicklungsverzögerungen führte (Kaneshrajah & Turner 2004; Williams *et al.* 2006; Clark *et al.* 2006; Boatright & Tomberlin 2010; Flores, Longnecker & Tomberlin 2014). Mehrere Studien konnten z.B. zeigen, dass das Wachstum auf Leber zu bestimmten Entwicklungszeiten während des Larvenwachstums signifikant kleinere Larven hervorbringt als gleich alte Larven, die beispielsweise auf Gehirn und Muskelgewebe gezüchtet wurden (Kaneshrajah & Turner 2004; Clark *et al.* 2006; Day & Wallman 2006). Neben einem signifikanten Längenunterschied waren auch die Entwicklungszeiten bei denen auf Leber gezüchteten Fliegenarten teils signifikant verzögert im Gegensatz zu den Entwicklungszeiten auf anderen Geweben, wie beispielsweise Muskel und Herz

(Clark *et al.* 2006; Thyssen *et al.* 2014; Bambaradeniya *et al.* 2017).

Zusätzlich zu einem gewebespezifischen Wachstum scheint bei der Verwendung gleichartiger Gewebe, wie Leber beispielsweise, auch ein artspezifisches Wachstumsverhalten zu existieren (Clark *et al.* 2006; Boatright & Tomberlin 2010; Wilson *et al.* 2014; Harnden & Tomberlin 2016). So zeigte sich, dass Larven der Schmeißfliege *Phormia regina* auf Wildfleisch zum gleichen Entwicklungszeitpunkt größer waren als Larven, die auf Schweinefleisch gezüchtet wurden (Wilson *et al.* 2014). Larven der forensisch relevanten Fliege *Lucilia sericata* waren auf Leber vom Schwein größer, als vergleichbar alte Larven, die sich auf Leber vom Rind entwickelten (Clark *et al.* 2006).

Obwohl Autoren erste Erkenntnisse bezüglich der Gewebe- und Artspezifität bereits seit den frühen 2000er Jahren publizierten, wurde die praktische Anwendbarkeit der Ergebnisse von Entwicklungsstudien, die auf unterschiedlichsten Geweben basieren, bislang nicht in Frage gestellt, diskutiert oder Vergleichsstudien zu menschlichem Geweben erwogen oder gefordert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals die Entwicklung einer forensisch relevanten Fliegenart, *Calliphora vicina*, auf verschiedenen Geweben vom Schwein (Leber, mageres Muskelfleisch und Hackfleisch) mit der Entwicklung auf humanem Muskelgewebe miteinander verglichen. Es wurden Längenmessungen der Larven 48 h, 72 h, und 96 h nach der Eiablage durchgeführt, sowie die Zeiten des Erreichens der Abwanderungsphase, der ersten Verpuppung und des Schlüpfens erster Fliegen notiert. Wie bei anderen Studien wurde eine gewebespezifische Entwicklung bei den auf Schwein herangezogenen Tieren beobachtet, wobei das larvale Längenwachstum deutlicher davon betroffen war, als die Entwicklungsdauer bis zum Erreichen der definierten Entwicklungslandmarken. Es stellte sich heraus, dass das Hackfleisch vom Schwein weder signifikante larvale Längenunterschiede, noch signifikante Entwicklungsdifferenzen im Vergleich zum human Muskelgewebe aufwies. Wie auch in den publizierten Studien zuvor (Kaneshrajah & Turner 2004; Clark *et al.* 2006; Thyssen *et al.* 2014), konnte aber auch in dieser Arbeit ein verzögertes Larvenwachstum auf Leber festgestellt werden.

Da die forensische Entomologie zum Ziel hat, das *minimale* PMI zu schätzen, ist es wichtig, Faktoren, die zur Berechnung eines zu langen Todeszeitraums führen, nach Möglichkeit zu erkennen und auszuschließen. Für die Weiterzucht fallrelevanter Proben, aber auch als Nährmedium für Entwicklungsstudien sollte daher von der Verwendung von Leber abgesehen werden, da sich das PMI_{min} fälschlicher Weise auf einen zu langen Zeitraum erstrecken könnte (Abb. 5). Zwar muss auch die Verwendung eines Nährmediums mit einer schnellen Wachstums- und Entwicklungsrate, wie das Hackfleisch beispielsweise, nicht zwingend zu dem korrektem Datum der Besiedlung führen (Abb. 5), jedoch ist die zeitliche Verkürzung des Intervalls aus forensischer Sicht weniger kritisch zu betrachten, da der Leichnam zu diesem späteren Zeitpunkt zumindest tot war und nicht, wie im umgekehrten Fall, evtl. noch gelebt haben könnte.

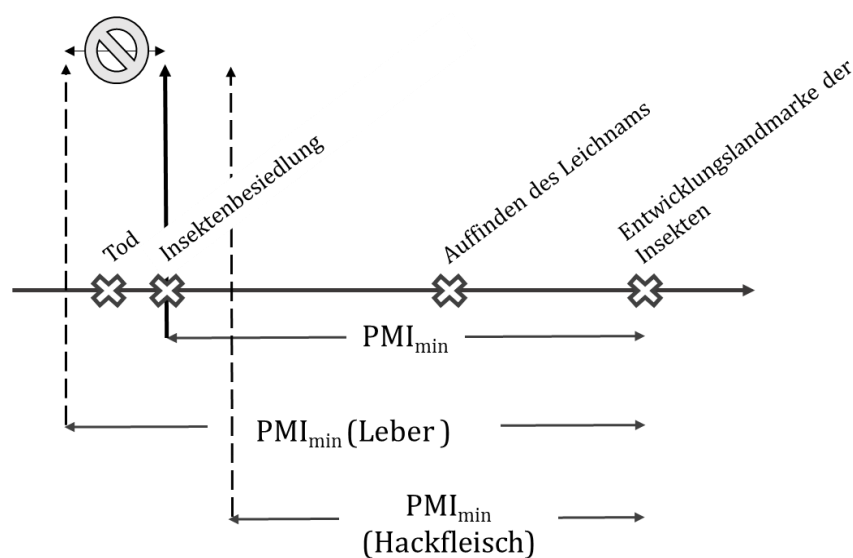


Abb. 5: Schema über den Einfluss des Nährgewebes auf die Entwicklung nekrophager Dipteren und die Folgen für die Berechnung des PMI_{min} . Die Verwendung von Leber führt zu einer zeitlichen Überschreitung des wahren PMI_{min} , während die Verwendung von Hackfleisch das PMI zeitlich unterschreitet. Die Folgen eines Überschreitens sind im Sinne des minimalen PMI allerdings gravierender als das zeitlich unterschreiten, da eine Person

Die Gründe des gewebespezifischen Wachstums sind nach wie vor nicht eindeutig geklärt. Prinzipiell sind zwei Erklärungsansätze denkbar. Ein Faktor könnte die Nährstoffzusammensetzung bzw. der Nährstoffgehalt des konsumierten Gewebes

sein (Michelbacher, Hoskins & Herms 1932; Sedee 1953; Brust & Fraenkel 1955). Sedee (1953) konnte mit Hilfe von halbsynthetischer Nahrung feststellen, dass Larven der Art *Calliphora vicina* für eine erfolgreiche Entwicklung Casein, Cholesterin, Salze, L-Cystin, B-Vitamine und Wasser benötigen. In der Komplexgruppe der B-Vitamine scheinen vor allem Thiamin (B₁), Riboflavin (B₂), Nicotinsäure (B₃) bzw. Nicotinamid, Panthothensäure (B₅), Pyridoxin (B₆-Gruppe), Folsäure (B₉), Biotin (B₇) und Cholin (ähnlich B₄) (Sedee 1953) eine bedeutende Rolle einzunehmen. Die Wichtigkeit des Cholesterins als Wachstumsfaktor erkannte bereits Hobson (1935). Jedoch scheinen andere Mitglieder der Gruppe der Sterine, wie Ergosterin, Lanosterin oder Sitosterin, einen weniger bedeutenden Einfluss auf das Wachstum zu haben (Hobson 1935). Basierend auf diesen Ergebnissen sollte Leber, die laut Datenbank der „USDA Food Composition Database“ (<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list>; Stand: Dezember 2017) zumindest ausreichend hohe Mengen an Cholesterin und B-Vitaminen aufweist, ein geeignetes Nährmedium für nekrophage Larven, wie *C. vicina*, sein. Da dies aber weder durch frühere Gewebestudien (Kaneshrajah & Turner 2004; Clark *et al.* 2006; Thyssen *et al.* 2014) noch durch diese Arbeit bestätigt werden konnte, müssen die Ursachen woanders gesucht werden.

Leber ist von seiner Gewebestruktur eines der kompaktesten Weichgewebe im Körper und fungiert u.a. als Glykogenspeicher (Welsch 2006; Reiser, Kuhn & Debus 2011). Durch diese Funktion enthält Leber Kohlenhydrate, die in diesen Mengen nicht in anderen Geweben, wie Muskel oder Gehirn, vorhanden sind. Die Verdauungssekrete von Larven enthalten jedoch hauptsächlich Lipase, Peptidase, Trypsinase und Collagenase und nur Spuren von Amylase, die für die Aufspaltung von Kohlenhydraten wichtig wäre (Wigglesworth 1935). Der Gedanke ist daher naheliegend, dass nekrophage Larven nicht in der Lage sind, das Lebergewebe vollends aufzuspalten. Zum einen fehlen ihnen die dazu nötigen Enzyme, wie größere Mengen Amylase oder Maltase (Wigglesworth 1935; Kamal 1959), und zum anderen nimmt es ggf. mehr Zeit in Anspruch, die dichte Gewebestruktur der Leber

mit Hilfe der vorhandenen Enzyme zu erschließen und die Nährstoffe für die weitere Aufnahme in den Körper zu Verfügung zu stellen.

Von einer weiteren Verwendung der Leber als Nährsubstrat für Entwicklungsstudien sollte daher prinzipiell in Zukunft abgesehen werden, da die Gewebeaufspaltung im Gegensatz zu anderen Geweben als fraglich erscheint. Zwar waren die Entwicklungsunterschiede zwischen der Leber und den restlichen Geweben in der vorliegenden Arbeit nicht von forensischer Relevanz, da sich die Angaben zum PMI_{\min} in einem forensisch entomologischen Gutachten aufgrund der Wachstums- und Entwicklungsvarianz auf Tage beziehen und nicht auf Stunden, dennoch sollten mögliche Fehlerquellen in Entwicklungsstudien ausgeschlossen werden.

Verteilung nekrophager Larven am menschlichen Körper

Die Bedeutung einzelner untersuchter Gewebe, wie Leber, Niere oder Herz und deren Verwendung in den bereits vorgestellten Gewebestudien (Kaneshrajah & Turner 2004; Clark *et al.* 2006; Day & Wallman 2006; Ireland & Turner 2006; El-Moaty & Kheirallah 2013; Thyssen *et al.* 2014; Bambaradeniya *et al.* 2017) ist bislang kaum belegt worden. Vielmehr scheint es, dass die verwendeten Gewebe für die Studien zufällig ausgewählt wurden. Basierend auf den signifikant unterschiedlichen, gewebespezifischen Entwicklungsraten empfiehlt ein Großteil der Autoren, die Körperregion oder das Gewebe, an dem sich die Larven an dem Leichnam befinden, zu notieren und bei der Schätzung des PMI_{\min} zu berücksichtigen. Inwiefern dieser Ratschlag in der Praxis realisierbar ist und eine gewebespezifische Bewertung der Entwicklung erfolgen kann, lassen die Autoren offen und stand daher im Fokus der vorliegenden Arbeit.

Die systematische Untersuchung von 51 mit Fliegenmaden befallenen Leichnamen hatte zum Ziel, die Verteilung der Larven am Körper und seiner Gewebe zu dokumentieren, sowie das Artvorkommen. Eine frühe Erkenntnis war, dass eine Zuordnung der Larven zu einem bestimmten Gewebe aufgrund von Fäulnis in manchen Fällen gar nicht möglich war. Zudem scheint kaum ein Gewebe eine

ausreichende Nahrungsquelle für hunderte oder tausende von Larven darzustellen, weshalb nicht ausgeschlossen werden kann, dass Larven im Laufe ihrer Entwicklung verschiedene Gewebe konsumieren und nicht nur ein einziges. Die Besiedlungshäufigkeit der inneren Gewebe/Organe der Brust- und Bauchhöhle, wie Leber, Herz, Niere oder Magen stellten sich als so gering dar, dass diese Gewebe für Studien nicht von Bedeutung sind. Selbst die Lunge, die deutlich häufiger besiedelt war, ist an sich für solche Studien zu vernachlässigen, da meist nur eine sehr geringe Anzahl an Larven vorgefunden wurde. Wenig überraschend war, dass Körperregionen, die auch häufig als Orte für die Eiablage bevorzugt werden, auch später für die weitere Entwicklung dienen: die Kopfregion mit ihren natürlichen Körperöffnungen (Augen & Mundhöhle und ihre verschiedenen Gewebe), sowie das Gehirn und die Luftröhre. Zukünftige Gewebestudien mit forensisch relevanten Fliegenarten sollten sich - basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit - auf Schleimhäute, Muskelgewebe (z.B. Zunge), Gehirn und Bindegewebe konzentrieren. Denkbar wäre auch eine Mischung aus den Geweben, da Larven während ihrer fressaktiven Phase am ehesten verschiedene Gewebetypen konsumieren.

Um systematisch nachvollziehen zu können, welche Gewebe eine Larve gefressen hat, wäre die Anwendung molekular-genetischer Methoden denkbar. Vor allem die Untersuchung von gewebespezifischer messenger-RNA (mRNA) (Haas *et al.* 2009; Visser *et al.* 2011; Lindenbergh *et al.* 2013), gewebespezifischen DNA-Methylierungsmustern (Frumkin *et al.* 2011; Lee *et al.* 2012, 2015; Kader & Ghai 2015) oder das Vorkommen gewebespezifischer micro-RNA's (miRNA) im Speisebrei der Larven wären theoretisch denkbar (Bartel 2004; Weber *et al.* 2010; Zubakov *et al.* 2010; Courts & Madea 2011; Wang *et al.* 2013; Sijen 2015). In Bezug auf den Nachweis einzelner Gewebe bzw. strukturfester Körpergewebe scheint die Analyse von mRNA am vielversprechendsten zu sein (Sijen 2015), da die Untersuchung von Methylierungsmustern sowie miRNA hauptsächlich für Körperflüssigkeiten, wie Blut, Speichel und Sperma erfolgreich getestet wurde (Sijen 2015). Es wäre demnach denkbar, die Nahrung aus dem Kropf der Maden zu extrahieren und durch gewebespezifische mRNA eine Gewebezuordnung

vorzunehmen. Da eine Gewebemischung wahrscheinlich wäre, müsste untersucht werden, in wie weit eine „Mischspur“ zu differenzieren wäre und wie stabil die mRNA mit zunehmender Zersetzung des Gewebes ist.

Artvorkommen nekrophager Dipteren an menschlichen Leichnamen in Deutschland

Das im Rahmen dieser Arbeit vorgefundene Artvorkommen forensisch relevanter Dipteren an Leichnamen stand prinzipiell im Einklang mit dem Artenspektrum der Sukzessionsstudien an Schweinekadavern aus Mitteleuropa, obwohl die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nur Momentaufnahmen der Insektenbesiedlung eines jeden Leichnams darstellen und nicht das sukzessive Artvorkommen dokumentiert werden konnte (Grassberger & Frank 2004; Matuszewski *et al.* 2008, 2011; Matuszewski, Szafałowicz & Jarmusz 2013; Anton, Niederegger & Beutel 2011; Mađra *et al.* 2015). Der Großteil der Larven (53,3 %) konnte der Familie der Schmeißfliegen (Diptera: Calliphoridae) zugeordnet werden, die insgesamt acht Arten stellte. Ferner konnten 33,3 % der Larven der Familie der Echten Fliegen (Diptera: Muscidae) zugeordnet werden, die mit fünf Arten vertreten war. Sowohl Fleischfliegen (Diptera: Sarcophagidae) als auch Buckelfliegen (Diptera: Phoridae) waren jeweils mit einer Art vertreten. Im Gegensatz zu den meisten Sukzessionsstudien mit Schweinekadavern konnte in der vorliegenden Arbeit nicht das Auftreten adulter Tiere berücksichtigt werden, da eine Fundortuntersuchung in den allermeisten Fällen nicht möglich war.

Prinzipiell scheint es eine Diskrepanz zwischen dem Artenspektrum adulter Fliegen am Leichnam bzw. Kadaver und dem tatsächlichen Vorkommen juveniler Fliegenarten zu geben (Grassberger & Frank 2004; Matuszewski *et al.* 2008; Anton *et al.* 2011; Szpila *et al.* 2015). So konnte wiederholt beobachtet werden, dass sich vor allem verschiedene Arten adulter Sarcophagidae um einen Kadaver herum aufhalten, jedoch kommt es nur selten zur Eiablage (Szpila *et al.* 2015). Bänziger & Pape (2004), die in ihrer Studie die Biologie von Fleischfliegen in Thailand untersuchten, konnten Larven verschiedener nekrophager Fleischfliegenarten zwar in Verbindung mit Aas

auffinden, jedoch waren bei einem Großteil der Fälle gleichzeitig auch Fäkalien präsent und waren damit ein zusätzlicher Reiz. Ebenso werden als koprophag geltende Arten auf Aas gefunden (Bänziger & Pape 2004). Skidmore (1985) beschrieb ein ähnlich flexibles Entwicklungs- bzw. Ernährungsverhalten für Muscidae, wie z.B. *Musca domestica*, deren Larven als nicht-karnivor beschrieben sind, jedoch wohl gelegentlich räuberisches Verhalten zeigen und ebenfalls an den Leichen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, vorkamen.

Das sukzessive Artvorkommen am Aas ist maßgeblich durch das zeitlich versetzte oder überlagerte Auftreten spezieller flüchtiger organischer Verbindungen (engl. *volatile organic compounds*; VOC) gesteuert (Forbes & Perrault 2014; Brodie *et al.* 2016; Verheggen *et al.* 2017). Verschiedene Studien (Brodie *et al.* 2016; Verheggen *et al.* 2017; Tomberlin *et al.* 2017) konnten diesbezüglich feststellen, dass manche VOCs artspezifisch als Lockstoffe fungieren und andere als Eiablage-Stimulans. Vor allem Indol und Dimethyltrisulfid (DMTS) (Nilssen *et al.* 1996; Brodie *et al.* 2016; Liu *et al.* 2016; Tomberlin *et al.* 2017) sind einer der ersten Stoffe, die früh nach Todeseintritt teils durch Bakterien freigesetzt werden und unterschiedliche Fliegenarten anlocken, wie Vertreter der Calliphoridae, Muscidae und Sarcophagidae (Fremdt & Amendt 2014; Verheggen *et al.* 2017). Jedoch wirken sie hauptsächlich bei den Schmeißfliegen als Stimulans zur Eiablage (Brodie *et al.* 2016; Verheggen *et al.* 2017). Diese Wirkweise erklärt die Diskrepanz zwischen der ebenfalls im Großraum Frankfurt am Main durchgeführten Studie von Fremdt & Amendt (2014) und der vorliegenden Arbeit. Die Köderfallen von Fremdt & Amendt (2014) waren mit Rinderleber bestückt und mit DMTS angereichert. Dadurch wurde eine Vielzahl verschiedener Schmeiß- und Fleischfliegenarten angelockt. Allerdings ist bislang nur ein Bruchteil der Arten, die in den Köderfallen gefunden wurden, auch als Larve am Leichnam zu finden. So fanden Fremdt & Amendt (2014) insgesamt 13 verschiedene Fleischfliegenarten, wovon in der vorliegenden Arbeit lediglich eine Art (*Sarcophaga argyrostoma*) als Larve an verschiedenen Leichnamen aufgefunden wurde. Auch in einer Studie von Cherix *et al.* (2012) aus der Schweiz wurde beobachtet, dass von fünf adulten Fleischfliegenarten, die an Leichenfundorten gesichert wurden, sich nur drei Arten

(*S. argyrostoma*, *S. caerulescens* und *S. similis*) tatsächlich als Larve am Leichnam entwickelten. In einem Zeitraum von 15 Jahren waren hier von insgesamt 23 Leichen allein 19 mit *S. argyrostoma* besiedelt und nur vier weitere Leichen mit einer der anderen beiden Arten (Cherix *et al.* 2012). Es scheinen demnach mehr Arten durch bestimmte VOCs angelockt zu werden und daher *nekrophil* zu sein, als tatsächlich zur Eiablage stimuliert zu werden und *nekrophage* Nachkommen auf Aas zu deponieren. Es ist darüber hinaus anzunehmen, dass nicht nur die Artzusammensetzung zwischen Köderfallen und Leichnamen verschieden ist, sondern sich ggf. auch die Artzusammensetzung zwischen Schweinekadavern und menschlichen Leichnamen unterscheidet. Stefanuto *et al.* (2015) untersuchten die VOC-Profile von Schweinekadavern und menschlichen Leichnamen und stellten „offensichtliche“ Unterschiede in der Zusammensetzung einzelner Komponenten fest. Vor allem der Anteil aromatischer Verbindungen war beim menschlichen Leichnam mehr als doppelt so hoch gegenüber den Schweinekadavern; hingegen waren Stickstoff- und Schwefelverbindungen um knapp mehr als die Hälfte reduziert. Der Anteil an DMTS und Dimethyldisulfid (DMDS) war beim Menschen ebenfalls geringer ausgefallen als beim Schwein (Stefanuto *et al.* 2015). Die Studie berücksichtigt zwar Insekten als zusätzlichen Verwesungsfaktor und vergleicht VOCs zwischen besiedelten und unbesiedelten Schweinen und Menschen; eine Artenliste wurde allerdings nicht erstellt.

Die Studie von Stefanuto *et al.* (2015) verdeutlicht die Relevanz der Verwendung menschlicher Leichen oder humaner Gewebe für die forensische Forschung. Seit 1981 existiert in Knoxville (Tennessee/USA) eine sogenannte *Anthropological research facility* (ARF), die umgangssprachlich auch als „Body Farm“ bezeichnet wird (Byard 2017). Seit den frühen 2000er Jahren stieg die Anzahl an Einrichtungen in den USA auf insgesamt sieben. In Australien wurde ebenfalls in jüngerer Zeit eine Einrichtung eröffnet und in den Niederlanden und Großbritannien ist jeweils eine in Planung (Blau 2017). Innerhalb dieser Einrichtungen ist es möglich, die Verwesung menschlicher Leichen wissenschaftlich zu beobachten und zu untersuchen. Hiervon profitieren nicht nur forensische Entomologen, die die Insektenfauna analysieren

können, sondern auch Anthropologen, Rechtsmediziner oder die Polizei. Hinsichtlich unterschiedlicher Klimata und damit einhergehend auch unterschiedlicher Insektenarten ist der bisherige Bestand an ARFs, der sich vorwiegend auf die USA beschränkt, als nicht ausreichend anzusehen. Vielmehr sollten weltweit flächendeckend ARFs entstehen, da sich forensisch entomologische Erkenntnisse aus den USA beispielsweise nicht auf das deutsche Klima und die Fauna übertragen lassen.

Die Rechtsgrundlage für eine solche Einrichtung in Deutschland ist in Bezug auf das Thema „Leichenversuche“ nicht eindeutig geklärt und äußert sich an verschiedenen Stellen in den Gesetzestexten nur vage (Kretschmer 2012). Weder das deutsche Bundesgesetz, noch die Landesgesetze stellen die Verwendung von Leichen für Forschungszwecke unter Verbot oder Strafe, wenn der Tote zu Lebzeiten eingewilligt hat, seinen Körper für die medizinische Weiterbildung und wissenschaftliche Untersuchungen zu spenden. Durch dieses Vorgehen wird sichergestellt bzw. ausgeschlossen, dass beispielsweise verstorbene Obdachlose ungefragt für Leichenversuche verwendet werden. Es scheint demgegenüber sogar äußerst populär zu sein, den eigenen Körper zu spenden, so dass ein tatsächliches Überangebot an Körperspenden existiert, die teilweise sogar von anatomischen Instituten abgelehnt werden müssen (Kretschmer 2012). Kretschmer (2012) appelliert deswegen an die Wissenschaftler, Versuche an Toten mit Verantwortung und kritischer Selbstprüfung durchzuführen.

Für die forensische Forschung oder die polizeiliche Ausbildung (von z.B. Leichenspürhunden, aber auch der Spurensicherung allgemein) scheint die Verwendung humaner Gewebe unumgänglich. So zum Beispiel auch bei der Validierung der Zuordnung entomologischer Spuren zu einer humanen Nahrungsquelle.

Methoden zur Zuordnung entomologischer Spuren zu ihrer ursprünglichen Nahrungsquelle

Neuere Methoden der forensischen Entomologie zielen auf die Altersbestimmung adulter Fliegen und die Verwitterung leerer Puparien ab, um das Zeitfenster für die Schätzung des PMI_{min} erweitern zu können. Ein Nachteil ist in diesem Kontext, dass diese Entwicklungsstadien *de facto* keinem Leichnam oder Tierkadaver mit Sicherheit zugeordnet werden können, da nur das fressende Larvenstadium ganz offensichtlich im unmittelbaren Kontakt mit der jeweiligen Nahrungsquelle steht. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, eine Methode zu entwickeln, die es erlaubt, die älteren Entwicklungsstadien einer humanen oder nicht-humanen Nahrungsquelle zuzuordnen zu können und dadurch die Etablierung der Altersbestimmung entomologischer Spuren zu unterstützen. Die Ergebnisse der Analyse stabiler Kohlenstoff- und Stickstoffisotope in adulten Fliegen, ihrer leeren Puparien und den jeweiligen Nährgeweben zeigten, dass sich die Isotopenverhältnisse der Nährgewebe in den entomologischen Spuren reflektieren und daher prinzipiell eine Zuordnung vorgenommen werden kann. Es konnte ebenso ein humanes Isotopenprofil detektiert werden, das sich von den getesteten Tiergeweben unterscheidet und ebenfalls in der Fliege und im Puparium erkennbar war. Da jedoch davon ausgegangen werden muss, dass es bei Mensch und Tier durch globale (Huelsemann *et al.* 2015) und individuelle Verhaltensmuster und Lebensräume (Petzke, Boeing & Metges 2005; Schoeninger 2014), zu unterschiedlichen Isotopensignaturen kommen kann, sollte bei jeder Analyse der entomologischen Spuren auch etwas Gewebe vom Leichnam und von fraglichen Tierkontaminationen mituntersucht werden.

Als problematisch ist das gleichzeitige Auftreten von toten Tieren, wie Hunden und Katzen zu werten, da sie ein ähnliches Nahrungsangebot wie der Mensch nutzen und dadurch vergleichbare Isotopenprofile aufweisen. Eine sichere Unterscheidung wäre bei gleichzeitigem Auftreten trotz zusätzlicher Gewebeuntersuchungen nicht mehr gegeben. Für solche Fälle wäre es sinnvoll, die Anwendbarkeit eines dritten Isotops, wie Schwefel beispielsweise, zu überprüfen. Ähnlich wie bei Kohlenstoffisotopen spiegeln sich auch die Isotopenverhältnisse von Schwefel annähernd eins zu eins

zwischen Nahrung und Konsument wider (Lehn & Graw 2014; Nehlich 2015). Anders als bei Kohlenstoff basieren unterschiedliche Schwefelisotopenverhältnisse jedoch nicht auf den Photosynthesewegen von Pflanzen, sondern auf einer unterschiedlichen Distanz zum Meer durch den sogenannten „Seaspray Effekt“ (Lehn & Graw 2014; Nehlich 2015). So wird der Regen, der in Richtung des Landesinneren zieht, isotopisch leichter ($\delta^{34}\text{S}$: +20 ‰ Küste \rightarrow +5 bis +10 ‰ Land). Darüber hinaus gibt es deutliche Unterschiede zwischen terrestrischen Tieren, Süßwassertieren, sowie marinen Tieren (Nehlich 2015). Es gäbe daher eine Chance, dass trotz ähnlicher trophischer (Nahrungs-)Stufe und ähnlicher Pflanzendiät eine Unterscheidung zwischen Mensch, Hund und/oder Katze auf Basis verschiedener Schwefelisotope möglich ist. Das Katzen- oder Hundefutter könnte beispielsweise aus einer anderen Region stammen und eine andere Schwefelisotopensignatur aufweisen, als die Nahrung des Menschen. Ein limitierender Faktor bezüglich des Nachweises der Schwefelisotope in den entomologischen Spuren könnte allerdings die chemische Zusammensetzung der Puparien sein, da nur geringe Mengen an Schwefel vorkommen bzw. nachweisbar sind (Gilby & McKellar 1970; Hackman & Goldberg 1971).

Bislang wurde für die Analyse der Kohlenstoff- und Stickstoffisotope eine komplette Fliege eingesetzt und das daraus resultierende Pulver eingewogen. Es wäre jedoch von Vorteil, nur bestimmte Körperteile der Fliege, wie z.B. die Flügel, für eine solche Analyse einsetzen zu können. Dadurch wären übrige Körperteile für die Methoden zur Altersbestimmung nutzbar (Abb. 6). Mit dem Kopf könnte eine Pteridinfluoreszenz-Analyse durchgeführt werden (Bernhardt *et al.* 2017a), mit Hilfe der Beine könnte eine n-Pentacosan-Quantifizierung erfolgen (Bernhardt *et al.* 2017b) und das Abdomen beispielsweise für die Einstufung der Ovarienentwicklung genutzt werden (Wall, Langley & Morgan 1991). Demnach könnten mindestens drei voneinander unabhängige Methoden zur Altersbestimmung adulter Fliegen an nur einem Individuum angewandt werden sowie die Zuordnung zur Nahrungsquelle mit Hilfe der stabilen Isotopenanalyse erfolgen.

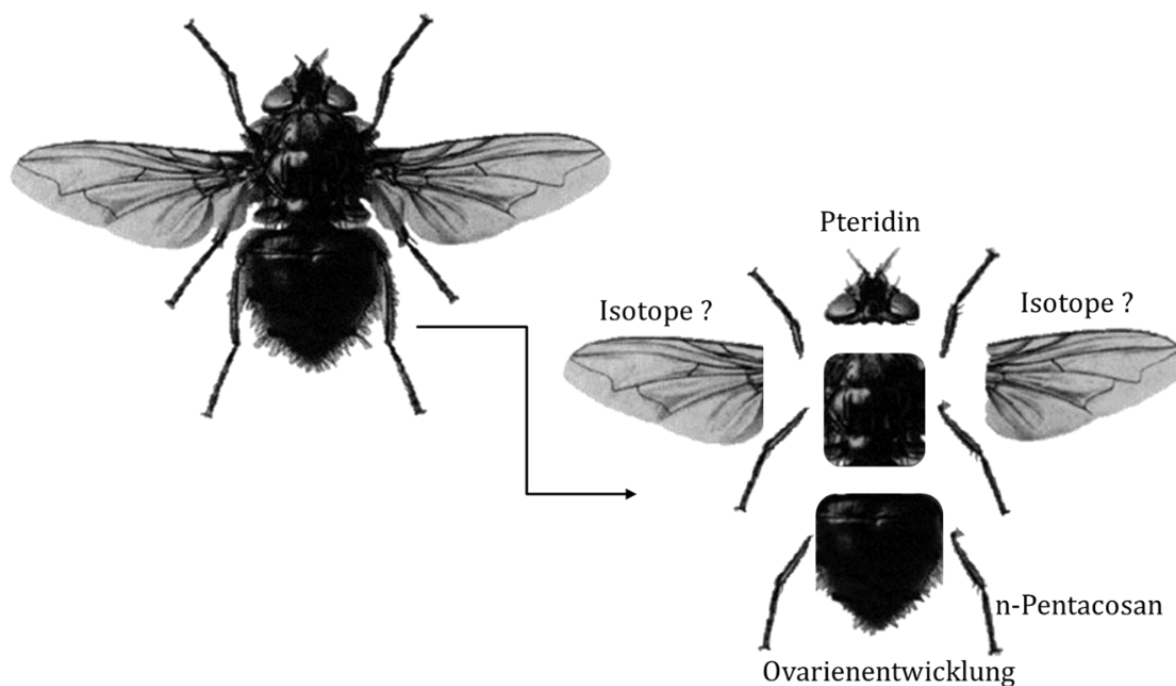


Abb. 6: Mögliche Aufteilung und der Nutzen einzelner Körperteile der Fliege für Analysen zur Altersbestimmung und Zuordnung zur Nahrungsquelle mittels Pteridinfluoreszenzanalyse (Kopf), n-Pentacosan-Quantifizierung (Beine) oder Ovarienentwicklung (Abdomen) und eventueller Isotopenuntersuchungen (Flügel).

Fazit und Ausblick

Die Berechnung des PMI_{\min} mit Hilfe der juvenilen Stadien nekrophager Insekten erfolgte bislang durch Längenmessungen oder Entwicklungszeiten der Tiere als artspezifische Funktion der Umgebungstemperatur. Durch Referenzdaten, die im Labor unter konstanten Temperaturen erhoben wurden, kann das Alter der Tiere abgeschätzt und eine Aussage über die minimale Leichenliegezeit getroffen werden. Diese Daten wurden für diverse nekrophage Fliegenarten mit Hilfe tierischer Nahrungsgewebe, das als Ersatz für humanes Material genutzt wurde, erhoben. Ein solches Vorgehen stellt jedoch eine potentielle Fehlerquelle dar, da das Wachstum der Fliegen auf humanem Gewebe unterschiedlich verlaufen könnte. Zudem fehlt es bislang an Erkenntnissen, an welchen Gewebearten bzw. Körperregionen des Menschen sich Larven bevorzugt aufhalten und entwickeln, sodass die Verwendung eines realistischen Gewebes für Laborstudien bislang nicht berücksichtigt werden konnte. Doch nicht nur die Bedeutung bzw. Bevorzugung bestimmter Gewebe

wurde bislang wenig untersucht, sondern auch die Zuordnung älterer Entwicklungsstadien, wie Puppe oder adulte Fliege zu ihrer ursprünglichen Nahrungsquelle, konnte bislang durch das Fehlen geeigneter Methoden nicht nachvollzogen werden.

Die vorliegende Arbeit hat erstmals forensisch entomologische Laboruntersuchungen mit humanem Muskelgewebe durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass das Wachstum und die juvenile Entwicklung von *C. vicina* auf humanem Muskelgewebe mit der Entwicklung auf Schweinehackfleisch vergleichbar ist. Auf dieser Basis kann auch die zukünftige Verwendung dieses Nahrungssubstrates in Entwicklungs- und Wachstumsstudien als Ersatz für humanes Muskelgewebe legitimiert werden. Da die Zusammensetzung von Hackfleisch jedoch regional und global variieren kann, sollte sich die zukünftige Forschung möglicherweise in Richtung eines künstlichen Nährgewebes orientieren, was zum einen in einer vergleichbaren Wachstumsrate und Entwicklungszeit zu humanem Gewebe resultiert und zum anderen weltweit einheitlich hergestellt werden kann, damit zukünftige Studien vergleichbar miteinander werden.

Neben der Verwendung eines humanen Gewebes für Laborstudien wurde auch erstmals das Besiedlungsmuster von 51 menschlichen Leichen im Zuge einer jeweiligen Obduktion systematisch untersucht. So konnte beispielsweise festgestellt werden, dass das Gehirn ein bevorzugtes Nährgewebe von Larven zu sein scheint und innere Organe, wie Leber, Herz, Niere und Lunge gar nicht oder nur äußerst selten besiedelt waren. Viele Studien (Kaneshrajah & Turner 2004; Clark *et al.* 2006; Ireland & Turner 2006; El-Moaty & Kheirallah 2013), die sich bisher mit der juvenilen Entwicklung nekrophager Dipteren auf verschiedenen Nährgeweben beschäftigt haben, erscheinen daher im Nachhinein realitätsfern, da Gewebe untersucht wurden, die in der Realität keine oder kaum Relevanz haben. Außerdem zeigte die vorliegende Arbeit, dass das Artvorkommen an den untersuchten Leichen weniger vielfältig war, als es bei der Monitoringstudie von Fremdt & Amendt (2014), die in der räumlich vergleichbaren Großraumregion Frankfurt am Main stattfand,

der Fall war. Durch den Zusatz künstlicher VOCs, wie DMTS, scheinen viel mehr *nekrophile* Arten angelockt worden zu sein, als in der Realität tatsächlich am Leichnam *nekrophage* Arten vorkommen. Da ein Körper aus einer Vielzahl von Geweben und Organen besteht und bei der Verwesung dadurch eine Vielzahl verschiedener VOCs entstehen, sollten zukünftige Monitoringstudien diese Vielfalt in ihren Ködern berücksichtigen und widerspiegeln. Dies kann durch die Verwendung verschiedener, künstlicher VOCs umgesetzt werden; als Orientierung kann hier die Studie von Stefanuto et al. (2015) herangezogen werden.

Die Methoden zur Altersbestimmung adulter Fliegen und zum Verwitterungsgrad ihrer leeren Puparien waren bislang in ihrer Anwendung beschränkt, da unter anderem argumentiert werden konnte, dass diese Stadien von einer anderen Nahrungsquelle, einem Tierkadaver beispielsweise, hätten stammen können und nicht von einem bestimmten Leichnam. Eine sichere Methode, die eine Zuordnung hätte erlauben können, war bislang nicht bekannt. Die vorliegende Arbeit schließt mit der Studie der Analyse stabiler Isotope diese Lücke. Es konnte gezeigt werden, dass Larven, die auf humanem Gewebe aufgewachsen sind, später in der Fliege und im Puparium ein human-spezifisches Isotopenprofil aufweisen, welches sich deutlich von den Isotopenprofilen unterscheiden, die aus der Entwicklung auf Tierkadavern resultieren. Bislang wurde eine komplette Fliege oder ein komplettes Puparium für eine solche Analyse eingesetzt. Zukünftige Studien sollten daher testen, ob auch die Verwendung einzelner Körperteile, wie beispielsweise der Flügel, ausreichend wären und zu einem ähnlichen Ergebnis führen. Dies hätte den Vorteil, dass dasselbe Tier für mehrere Methoden der Altersbestimmung und für die Bestimmung der Nahrungsquelle genutzt werden könnte.

Literatur

- Agrawal, A.A. (2001) Phenotypic plasticity in the interactions and evolution of species. *Science*, **294**, 321–6.
- Ambrose, S.H. (1991) Effects of diet, climate and physiology on nitrogen isotope abundances in terrestrial foodwebs. *Journal of Archaeological Science*, **18**, 293–317.
- Amendt, J. (2007) Forensische Entomologie. *Kriminalbiologie* (eds B. Herrmann & K.-S. Saternus), pp. 221–241. Springer.
- Amendt, J., Campobasso, C.P., Gaudry, E., Reiter, C., LeBlanc, H.N. & Hall, M.J.R. (2007) Best practice in forensic entomology--standards and guidelines. *International Journal of Legal Medicine*, **121**, 90–104.
- Amendt, J., Krettek, R. & Zehner, R. (2004) Forensic entomology. *Naturwissenschaften*, **91**, 51–65.
- Amendt, J., Richards, C.S., Campobasso, C.P., Zehner, R. & Hall, M.J.R. (2011) Forensic entomology: applications and limitations. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, **7**, 379–92.
- Ames, C. & Turner, B. (2003) Low temperature episodes in development of blowflies: implications for postmortem interval estimation. *Medical and Veterinary Entomology*, **17**, 178–186.
- Anton, E., Niederegger, S. & Beutel, R.G. (2011) Beetles and flies collected on pig carrion in an experimental setting in Thuringia and their forensic implications. *Medical and Veterinary Entomology*, **25**, 353–364.
- Aubernon, C., Boulay, J., Hédouin, V. & Charabidzé, D. (2016) Thermoregulation in gregarious dipteran larvae: evidence of species-specific temperature selection. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **160**, 101–108.
- Bambaradeniya, Y.T.B., Karunaratne, W.I.P., Tomberlin, J.K., Goonerathne, I. & Kotakadeniya, R.B. (2017) Temperature and tissue type impact development of *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae) in Sri Lanka. *Journal of Medical Entomology*. doi: 10.1093/jme/tjx211 *in press*
- Bänziger, H. & Pape, T. (2004) Flowers, faeces and cadavers: natural feeding and

-
- laying habits of flesh flies in Thailand (Diptera: Sarcophagidae, *Sarcophaga* spp.). *Journal of Natural History*, **38**, 1677–1694.
- Bartel, D.P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, **116**, 281–97.
- Ben-David, M. & Flaherty, E.A. (2012) Stable isotopes in mammalian research: a beginner's guide. *Journal of Mammalogy*, **93**, 312–328.
- Bennett, P.M. & Hobson, K.A. (2009) Trophic structure of a boreal forest arthropod community revealed by stable isotope ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) analyses. *Entomological Science*, **12**, 17–24.
- Bernhardt, V., Fremd, H., Huibregts, H., Geduld, L., Verhoff, M.A. & Amendt, J. (2016) *Muscina prolapsa* (Harris 1780): Ein bislang unterschätztes Werkzeug der forensischen Entomologie. *Rechtsmedizin*, **26**, 97–102.
- Bernhardt, V., Hannig, L., Kinast, R., Verhoff, M.A., Rothweiler, F., Zehner, R. & Amendt, J. (2017a) Quantitative pteridine fluorescence analysis: a possible age-grading technique for the adult stages of the blow fly *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Insect Physiology*, **98**, 356–359.
- Bernhardt, V., Pogoda, W., Verhoff, M.A., Toennes, S.W. & Amendt, J. (2017b) Estimating the age of the adult stages of the blow flies *Lucilia sericata* and *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) by means of the cuticular hydrocarbon n-pentacosane. *Science and Justice*, **57**, 361–365.
- Blau, S. (2017) Body farms. *Forensic Science, Medicine and Pathology*, **13**, 484–486.
- Boatright, S.A. & Tomberlin, J.K. (2010) Effects of temperature and tissue type on the development of *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Medical Entomology*, **47**, 917–923.
- Brodie, B.S., Babcock, T., Gries, R., Benn, A. & Gries, G. (2016) Acquired smell? Mature females of the common green bottle fly shift semiochemical preferences from feces feeding sites to carrion oviposition sites. *Journal of Chemical Ecology*, **42**, 40–50.
- Broecker, W. & Kulp, J. (1956) The radiocarbon method of age determination. *American Antiquity*, **22**, 1–11.

-
- Brust, M. & Fraenkel, G. (1955) The nutritional requirements of the larvae of a blowfly, *Phormia regina* (Meig.). *Physiological Zoology*, **28**, 186–204.
- Byard, R.W. (2017) Body farms – characteristics and contributions. *Forensic Science, Medicine and Pathology*, **13**, 473–474.
- Byrd, J.H. & Allen, J.C. (2001) The development of the black blow fly, *Phormia regina* (Meigen). *Forensic Science International*, **120**, 79–88.
- Cherix, D., Wyss, C. & Pape, T. (2012) Occurrences of flesh flies (Diptera: Sarcophagidae) on human cadavers in Switzerland, and their importance as forensic indicators. *Forensic Science International*, **220**, 158–163.
- Clark, K., Evans, L. & Wall, R. (2006) Growth rates of the blowfly, *Lucilia sericata*, on different body tissues. *Forensic Science International*, **156**, 145–9.
- Courts, C. & Madea, B. (2011) Specific micro-RNA signatures for the detection of saliva and blood in forensic body-fluid identification. *Journal of Forensic Sciences*, **56**, 1464–1470.
- Crawford, K., McDonald, R.A. & Bearhop, S. (2008) Applications of stable isotope techniques to the ecology of mammals. *Mammal Review*, **38**, 87–107.
- Day, D.M. & Wallman, J.F. (2006) Influence of substrate tissue type on larval growth in *Calliphora augur* and *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Forensic Sciences*, **51**, 657–63.
- DeNiro, M.J. & Epstein, S. (1978) Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **42**, 495–506.
- DeNiro, M.J. & Epstein, S. (1981) Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **45**, 341–351.
- Dettmeyer, R.B., Schütz, H.F. & Verhoff, M.A. (2014) Thanatologie., *Rechtsmedizin*, pp. 7–22. Springer.
- Disney, R.H.L. (2005) Duration of development of two species of carrion-breeding scuttle flies and forensic implications. *Medical and Veterinary Entomology*, **19**, 229–35.
- Donovan, S.E., Hall, M.J.R., Turner, B.D. & Moncrieff, C.B. (2006) Larval growth rates of the blowfly, *Calliphora vicina*, over a range of temperatures. *Medical and*

-
- Veterinary Entomology*, **20**, 106–14.
- Easton, A.M. & Smith, K.G. V. (1970) The entomology of the cadaver. *Medicine, Science and the Law*, **10**, 208–215.
- Eggers, T. & Jones, T.H. (2000) You are what you eat...or are you? *Trends in Ecology and Evolution*, **15**, 265–266.
- El-Moaty, Z.A. & Kheirallah, A.E.M. (2013) Developmental variation of the blow fly *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) (Diptera: Calliphoridae) by different substrate tissue types. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, **16**, 297–300.
- Eschelbach, R. (2013) Vorbereitung und Erhebung der öffentlichen Klage. *Handbuch für den Staatsanwalt*, 4th ed (eds H. Vordermayer & B. Heintschel-Heinegg), pp. 787–837. Carl Heymanns Verlag.
- Evrard, J., Buxton, B. & Erikson, D. (1976) How long dead? *British medical journal*, **2**, 661.
- Flores, M., Longnecker, M. & Tomberlin, J.K. (2014) Effects of temperature and tissue type on *Chrysomya rufifacies* (Diptera: Calliphoridae) (Macquart) development. *Forensic Science International*, **245C**, 24–29.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, **3**, 294–299.
- Forbes, S.L. & Perrault, K.A. (2014) Decomposition odour profiling in the air and soil surrounding vertebrate carrion (ed IA Hansen). *PLoS ONE*, **9**, e95107.
- Frache, C., Lindström, K. & Elmerich, C. (2009) Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil*, **321**, 35–59.
- Fremdt, H. & Amendt, J. (2014) Species composition of forensically important blow flies (Diptera: Calliphoridae) and flesh flies (Diptera: Sarcophagidae) through space and time. *Forensic Science International*, **236**, 1–9.
- Frumkin, D., Wasserstrom, A., Budowle, B. & Davidson, A. (2011) DNA methylation-based forensic tissue identification. *Forensic Science International*:

-
- Genetics*, **5**, 517–524.
- Fry, B. (2006) *Stable Isotope Ecology*. Springer.
- Gaudry, E. & Dourel, L. (2013) Forensic entomology: implementing quality assurance for expertise work. *International Journal of Legal Medicine*, **127**, 1031–1037.
- Gilby, A.R. & McKellar, J.W. (1970) The composition of the empty puparia of a blowfly. *Journal of Insect Physiology*, **16**, 1517–1529.
- Grassberger, M. & Frank, C. (2004) Initial study of arthropod succession on pig carrion in a central european urban habitat. *Journal of Medical Entomology*, **41**, 511–523.
- Grassberger, M., Friedrich, E. & Reiter, C. (2003) The blowfly *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) as a new forensic indicator in Central Europe. *International Journal of Legal Medicine*, **117**, 75–81.
- Grassberger, M. & Reiter, C. (2001) Effect of temperature on *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) development with special reference to the isomegalen- and isomorphen-diagram. *Forensic Science International*, **120**, 32–36.
- Grassberger, M. & Reiter, C. (2002) Effect of temperature on development of the forensically important holarctic blow fly *Protophormia terraenovae* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Science International*, **128**, 177–182.
- Greenberg, B. (1991) Flies as forensic indicators. *Journal of Medical Entomology*, **28**, 13.
- Greenberg, B. & Kunich, J.C. (2002) *Entomology and the Law: Flies as Forensic Indicators*. Cambridge University Press.
- Greenberg, B. & Tantawi, T.I. (1993) Different developmental strategies in two boreal blow flies (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Medical Entomology*, **30**, 481–484.
- Gunn, A. (2009) *Essential Forensic Biology*, 2nd ed. Wiley-Blackwell.
- Haas, C., Klessner, B., Maake, C., Bär, W. & Kratzer, A. (2009) mRNA profiling for body fluid identification by reverse transcription endpoint PCR and realtime PCR. *Forensic Science International: Genetics*, **3**, 80–88.

-
- Hackman, R.H. & Goldberg, M. (1971) Studies on the hardening and darkening of insect cuticles. *Journal of Insect Physiology*, **17**, 335–347.
- Harnden, L.M. & Tomberlin, J.K. (2016) Effects of temperature and diet on black soldier fly, *Hermetia illucens* (L.) (Diptera: Stratiomyidae), development. *Forensic Science International*, **266**, 109–116.
- Heinrich, K., Weaver, R.J. & Bell, H.A. (2012) Determining the source of house flies (*Musca domestica*) using stable isotope analysis. *Pest Management Science*, **68**, 31–37.
- Hobson, R.P. (1935) On a fat-soluble growth factor required by blow-fly larvae: Identity of the growth factor with cholesterol. *The Biochemical Journal*, **29**, 2023–6.
- Hobson, K.A. (1999) Tracing origins and migration of wildlife using stable isotopes: a review. *Oecologia*, **120**, 314–326.
- Hochmeister, M., Grassberger, M. & Stimpfl, T. (2007) *Forensische Medizin Für Studium Und Praxis*. Maudrich.
- Hopkins, J.B. & Kurle, C.M. (2016) Measuring the realized niches of animals using stable isotopes: from rats to bears. *Methods in Ecology and Evolution*, **7**, 210–221.
- Huelsemann, F., Lehn, C., Schneider, S., Jackson, G., Hill, S., Rossmann, A., Scheid, N., Dunn, P.J.H., Flenker, U. & Schänzer, W. (2015) Global spatial distributions of nitrogen and carbon stable isotope ratios of modern human hair. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **29**, 2111–2121.
- Hyodo, F. (2015) Use of stable carbon and nitrogen isotopes in insect trophic ecology. *Entomological Science*, **18**, 295–312.
- Ireland, S. & Turner, B. (2006) The effects of larval crowding and food type on the size and development of the blowfly, *Calliphora vomitoria*. *Forensic Science International*, **159**, 175–81.
- Kader, F. & Ghai, M. (2015) DNA methylation and application in forensic sciences. *Forensic Science International*, **249**, 255–265.
- Kadereit, J.W., Körner, C., Kost, B. & Sonnewald, U. (2014) *Strasburger – Lehrbuch Der Pflanzenwissenschaften*. Springer.

-
- Kamal, A.S. (1959) Comparative studies of thirteen species of sarcosaprophagous Calliphoridae and Sarcophagidae (Diptera) II. Digestive Enzymology. *Annals of the Entomological Society of America*, **52**, 167–173.
- Kaneshrajah, G. & Turner, B. (2004) *Calliphora vicina* larvae grow at different rates on different body tissues. *International Journal of Legal Medicine*, **118**, 242–4.
- Kretschmer, B. (2012) Leichenversuche im Dienste der Wissenschaft und der Patientenversorgung. *Rechtsfragen der Obduktion und postmortalen Gewebespende* (eds A. Wienke, M.A. Rothschild & K. Janke), pp. 53–80. Springer.
- Lee, H.Y., An, J.H., Jung, S.E., Oh, Y.N., Lee, E.Y., Choi, A., Yang, W.I. & Shin, K.J. (2015) Genome-wide methylation profiling and a multiplex construction for the identification of body fluids using epigenetic markers. *Forensic Science International: Genetics*, **17**, 17–24.
- Lee, H.Y., Park, M.J., Choi, A., An, J.H., Yang, W.I. & Shin, K.-J. (2012) Potential forensic application of DNA methylation profiling to body fluid identification. *International Journal of Legal Medicine*, **126**, 55–62.
- Lehn, C. & Graw, M. (2014) Stabilisotopenanalysen an Körpergeweben von unbekanntem Personen: Grundlagen, Probennahme, Analysen, Interpretation. *Rechtsmedizin*, **24**, 129–143.
- Li, K., Ye, G.Y., Zhu, J.Y. & Hu, C. (2007) Detection of food source by PCR analysis of the gut contents of *Aldrichina grahami* (Aldrich) (Diptera: Calliphoridae) during post-feeding period. *Insect Science*, **14**, 47–52.
- Lindenbergh, A., van den Berge, M., Oostra, R.-J., Cleypool, C., Bruggink, A., Kloosterman, A. & Sijen, T. (2013) Development of a mRNA profiling multiplex for the inference of organ tissues. *International Journal of Legal Medicine*, **127**, 891–900.
- Liu, W., Longnecker, M., Tarone, A.M. & Tomberlin, J.K. (2016) Responses of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) to compounds from microbial decomposition of larval resources. *Animal Behaviour*, **115**, 217–225.
- Long, L.E. (1998) Rubidium-strontium method. *Geochemistry*, pp. 556–561. Kluwer Academic Publishers.

-
- Lothe, F. (1964) The use of larval infestation in determining time of death. *Medicine, Science and the Law*, **4**, 113–115.
- de Lourdes Chávez-Briones, M., Hernández-Cortés, R., Díaz-Torres, P., Niderhauser-García, A., Ancer-Rodríguez, J., Jaramillo-Rangel, G. & Ortega-Martínez, M. (2013) Identification of human remains by DNA analysis of the gastrointestinal contents of fly larvae. *Journal of Forensic Sciences*, **58**, 248–250.
- Madea, B. (2003) *Rechtsmedizin - Befunderhebung Rekonstruktion Begutachtung*, 3rd ed (ed B Madea). Springer.
- Madea, B., Wiegand, P. & Mußhoff, F. (2015) Aufgaben und Struktur des Faches. *Rechtsmedizin*, pp. 1–15. Springer.
- Mađra, A., Frątczak, K., Grzywacz, A. & Matuszewski, S. (2015) Long-term study of pig carrion entomofauna. *Forensic Science International*, **252**, 1–10.
- Marchenko, M.I. (2001) Medicolegal relevance of cadaver entomofauna for the determination of the time of death. *Forensic Science International*, **120**, 89–109.
- Marchetti, D., Arena, E., Boschi, I. & Vanin, S. (2013) Human DNA extraction from empty puparia. *Forensic Science International*, **229**, e26–e29.
- Markow, T.A., Anwar, S. & Pfeiler, E. (2000) Stable isotope ratios of carbon and nitrogen in natural populations of *Drosophila* species and their hosts. *Functional Ecology*, **14**, 261–266.
- Matuszewski, S., Bajerlein, D., Konwerski, S. & Szpila, K. (2008) An initial study of insect succession and carrion decomposition in various forest habitats of Central Europe. *Forensic Science International*, **180**, 61–9.
- Matuszewski, S., Bajerlein, D., Konwerski, S. & Szpila, K. (2011) Insect succession and carrion decomposition in selected forests of Central Europe. Part 3: Succession of carrion fauna. *Forensic Science International*, **207**, 150–163.
- Matuszewski, S., Szfałowicz, M. & Jarmusz, M. (2013) Insects colonising carcasses in open and forest habitats of Central Europe: Search for indicators of corpse relocation. *Forensic Science International*, **231**, 234–239.
- Mégnin, P. (1894) *La Faune Des Cadavres: Application de L'entomologie a La Médecine Légale*. Masson & Gauthier-Villars.

-
- Meier-Augenstein, W. (2010) *Stable Isotope Forensics- An Introduction to the Forensic Application of Stable Isotope Analysis*. Wiley Blackwell.
- Michelbacher, A.E., Hoskins, W.M. & Herms, W.B. (1932) The nutrition of flesh fly larvae *Lucilia sericata* (Meig.). *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*, **64**, 109–131.
- Minagawa, M. & Wada, E. (1984) Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: Further evidence and the relation between $\delta^{15}\text{N}$ and animal age. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **48**, 1135–1140.
- Nabity, P.D., Higley, L.G. & Heng-Moss, T.M. (2006) Effects of temperature on development of *Phormia regina* (Diptera: Calliphoridae) and use of developmental data in determining time intervals in forensic entomology. *Journal of Medical Entomology*, **43**, 1276–1286.
- Nahrman, J., Amendt, J., Zehner, R. & Parzeller, M. (2016) „Flora und Fauna“ in der Kriminalistik – Eine Bestandsaufnahme der aktuellen Anwendung und Bedeutung von nicht humanen, biologischen Untersuchungsmaterialien im Strafverfahren. *Archiv für Kriminologie*, **238**, 81–98.
- Nehlich, O. (2015) The application of sulphur isotope analyses in archaeological research: A review. *Earth-Science Reviews*, **142**, 1–17.
- Niederegger, S., Pastuschek, J. & Mall, G. (2010) Preliminary studies of the influence of fluctuating temperatures on the development of various forensically relevant flies. *Forensic Science International*, **199**, 72–8.
- Nilssen, A.C., Tømmerås, B.Å., Schmid, R. & Evensen, S.B. (1996) Dimethyl trisulphide is a strong attractant for some calliphorids and a muscid but not for the reindeer oestrids *Hypoderma tarandi* and *Cephenemyia trompe*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **79**, 211–218.
- Nuorteva, P., Isokoski, M. & Laiho, K. (1967) Studies on the possibilities of using blowflies (Dipt.) as medicolegal indicators in Finland. *Ann. Ent. Fenn.*, **33**, 217–225.
- Ohkouchi, N., Ogawa, N.O., Chikaraishi, Y., Tanaka, H. & Wada, E. (2015) Biochemical and physiological bases for the use of carbon and nitrogen

-
- isotopes in environmental and ecological studies. *Progress in Earth and Planetary Science*, **2**, 1.
- Payne, J.A. (1965) A summer carrion study of the baby pig *Sus scrofa* Linnaeus. *Ecology*, **46**, 592–602.
- Pechal, J.L., Moore, H., Drijfhout, F. & Benbow, M.E. (2014) Hydrocarbon profiles throughout adult Calliphoridae aging: A promising tool for forensic entomology. *Forensic Science International*, **245**, 65–71.
- Perkins, M.J., McDonald, R.A., Van Veen, F.J.F., Kelly, S.D., Rees, G. & Bearhop, S. (2014) Application of nitrogen and carbon stable isotopes ($\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$) to quantify food chain length and trophic structure. *PLoS ONE*, **9**, e93281.
- Peterson, B.J. & Fry, B. (1987) Stable isotopes in ecosystem studies. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **18**, 293–320.
- Petzke, K.J., Boeing, H. & Metges, C.C. (2005) Choice of dietary protein of vegetarians and omnivores is reflected in their hair protein ^{13}C and ^{15}N abundance. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **19**, 1392–400.
- Phillips, D.L., Inger, R., Bearhop, S., Jackson, A.L., Moore, J.W., Parnell, A.C., Semmens, B.X. & Ward, E.J. (2014) Best practices for use of stable isotope mixing models in. *Canadian Journal of Zoology*, **835**, 823–835.
- Reed, H.B. (1958) A study of dog carcass communities in Tennessee, with special reference to the insects. *American Midland Naturalist*, **59**, 213.
- Reiser, M., Kuhn, F.-P. & Debus, J. (eds). (2011) *Radiologie*. Georg Thieme Verlag.
- Reiter, C. (1984) Zum Wachstumsverhalten der Maden der blauen Schmeißfliege *Calliphora vicina*. *Rechtsmedizin*, **91**, 295–308.
- Richards, C.S., Crous, K.L. & Villet, M.H. (2009) Models of development for blowfly sister species *Chrysomya chloropyga* and *Chrysomya putoria*. *Medical and Veterinary Entomology*, **23**, 56–61.
- Richards, C.S., Paterson, I.D. & Villet, M.H. (2008) Estimating the age of immature *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae), correcting for temperature and geographical latitude. *International Journal of Legal Medicine*, **122**, 271–9.
- Richards, C.S., Rowlinson, C.C., Cuttiford, L., Grimsley, R. & Hall, M.J.R. (2013)

-
- Decomposed liver has a significantly adverse affect on the development rate of the blowfly *Calliphora vicina*. *International Journal of Legal Medicine*, **127**, 259–62.
- Sanford, M.R. (2015) Forensic entomology of decomposing humans and their decomposing pets. *Forensic Science International*, **247**, e11-17.
- Schoeninger, M.J. (1995) Stable isotope studies in human evolution. *Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews*, **4**, 83–98.
- Schoeninger, M.J. (2014) Stable isotope analyses and the evolution of human diets. *Annual Review of Anthropology*, **43**, 413–430.
- Sedee, P.D.J.W. (1953) Qualitative vitamin requirements for growth of larvae of *Calliphora erythrocephala* (Meig). *Experientia*, **9**, 142–143.
- Shahid, S.A., Schoenly, K.G., Haskell, N.H., Hall, R.D. & Zhang, W. (2003) Carcass enrichment does not alter decay rates or arthropod community structure: A test of the arthropod saturation hypothesis at the anthropology research facility in Knoxville, Tennessee. *Journal of Medical Entomology*, **40**, 559–569.
- Sijen, T. (2015) Molecular approaches for forensic cell type identification: On mRNA, miRNA, DNA methylation and microbial markers. *Forensic Science International: Genetics*, **18**, 21–32.
- Skidmore, P. (1985) *The Biology of the Muscidae of the World*. Springer.
- Smith, K.G.V. (1986) *A Manual of Forensic Entomology*. British Museum (Natural History) and Cornell University Press.
- Smith, K.E. & Wall, R. (1997) The use of carrion as breeding sites by the blowfly *Lucilia sericata* and other Calliphoridae. *Medical and Veterinary Entomology*, **11**, 38–44.
- Stefanuto, P.H., Perrault, K.A., Stadler, S., Pesesse, R., Leblanc, H.N., Forbes, S.L. & Focant, J.F. (2015) GC × GC-TOFMS and supervised multivariate approaches to study human cadaveric decomposition olfactive signatures. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **407**, 4767–4778.
- Szpila, K. (2012) Key for the identification of European and Mediterranean blowflies (Diptera, Calliphoridae) of medical and veterinary importance – adult

-
- flies. *Forensic entomology: an introduction, 2nd edition* (ed D. Gennard), pp. 77–81. Wiley-Blackwell.
- Szpila, K., Mađra, A., Jarmusz, M. & Matuszewski, S. (2015) Flesh flies (Diptera: Sarcophagidae) colonising large carcasses in Central Europe. *Parasitology Research*, **114**, 2341–2348.
- Thyssen, P.J. acquelin., de Souza, C.M. ar., Shimamoto, P.M., Salewski, T. de B. & Moretti, T.C. (2014) Rates of development of immatures of three species of *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) reared in different types of animal tissues: implications for estimating the postmortem interval. *Parasitology Research*, **113**, 3373–3380.
- Tibbets, T.M., Wheelless, L.A. & Del Rio, C.M. (2008) Isotopic enrichment without change in diet: An ontogenetic shift in $\delta^{15}\text{N}$ during insect metamorphosis. *Functional Ecology*, **22**, 109–113.
- Tomberlin, J.K., Crippen, T.L., Wu, G., Griffin, A.S., Wood, T.K. & Kilner, R.M. (2017) Indole: An evolutionarily conserved influencer of behavior across kingdoms. *BioEssays*, **39**, 1600203.
- Tomberlin, J.K., Mohr, R., Benbow, M.E., Tarone, A.M. & VanLaerhoven, S. (2011) A roadmap for bridging basic and applied research in forensic entomology. *Annual Review of Entomology*, **56**, 401–421.
- Verheggen, F., Perrault, K.A., Megido, R.C., Dubois, L.M., Francis, F., Haubruge, E., Forbes, S.L., Focant, J.F. & Stefanuto, P.H. (2017) The odor of death: an overview of current knowledge on characterization and applications. *BioScience*, **67**, 600–613.
- Villet, M.H. & Amendt, J. (2011) Advances in entomological methods for death time estimation. *Forensic Pathology Reviews*, **6**, 213–237.
- Visser, M., Zubakov, D., Ballantyne, K.N. & Kayser, M. (2011) mRNA-based skin identification for forensic applications. *International Journal of Legal Medicine*, **125**, 253–263.
- Wall, R., Langley, P.A. & Morgan, K.L. (1991) Ovarian development and pteridine accumulation for age determination in the blowfly *Lucilia sericata*. *Journal of Insect*

-
- Physiology*, **37**, 863–868.
- Wang, Y., Li, L., Wang, J., Wang, M., Yang, L., Tao, L., Zhang, Y., Hou, Y., Chu, J. & Hou, Z. (2016) Development of the green bottle fly *Lucilia illustris* at constant temperatures. *Forensic Science International*, **267**, 136–144.
- Wang, Y., Ma, M.-Y., Jiang, X.-Y., Wang, J.-F., Li, L.-L., Yin, X.-J., Wang, M., Lai, Y. & Tao, L.-Y. (2017) Insect succession on remains of human and animals in Shenzhen, China. *Forensic Science International*, **271**, 75–86.
- Wang, Z., Zhang, J., Luo, H., Ye, Y., Yan, J. & Hou, Y. (2013) Screening and confirmation of microRNA markers for forensic body fluid identification. *Forensic Science International: Genetics*, **7**, 116–123.
- Wardle, R.A. (1930) Significant variables in the blowfly environment. *Annals of Applied Biology*, **17**, 554–574.
- Warren, J.-A. & Anderson, G.S. (2013) The development of *Protophormia terraenovae* (Robineau-Desvoidy) at constant temperatures and its minimum temperature threshold. *Forensic Science International*, **233**, 374–9.
- Weber, J.A., Baxter, D.H., Zhang, S., Huang, D.Y., Huang, K.H., Lee, M.J., Galas, D.J. & Wang, K. (2010) The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clinical Chemistry*, **56**, 1733–1741.
- Wells, J.D., Introna, F., Di Vella, G., Campobasso, C.P., Hayes, J. & Sperling, F.A.H. (2001) Human and insect mitochondrial DNA analysis from maggots. *Journal of Forensic Sciences*, **46**, 1502J.
- Welsch, U. (2006) *Lehrbuch Histologie*, 4. Aufl. Elsevier.
- Whitman, D.W. & Agrawal, A.A. (2009) What is phenotypic plasticity and why is it important? *Phenotypic Plasticity of Insects: Mechanisms and Consequences* (eds D.W. Whitman & T.N. Ananthakrishnan), pp. 1–63. CRC Press.
- Wigglesworth, V.B. (1935) *Insect Physiology*. Methuen & Co. LTD.
- Williams, P.D., Day, T., Fletcher, Q. & Rowe, L. (2006) The shaping of senescence in the wild. *Trends in Ecology and Evolution*, **21**, 458–463.
- Wilson, J.M., Lafon, N.W., Kreitlow, K.L., Brewster, C.C. & Fell, R.D. (2014) Comparing growth of pork- and venison-reared *Phormia regina* (Diptera:

-
- Calliphoridae) for the application of forensic entomology to wildlife poaching. *Journal of Medical Entomology*, **51**, 1067–72.
- Zehner, R., Amendt, J. & Krettek, R. (2004) STR typing of human DNA from fly larvae fed on decomposing bodies. *Journal of Forensic Sciences*, **49**, 1–4.
- Zhu, G.H., Jia, Z.J., Yu, X.J., Wu, K.S., Chen, L.S., Lv, J.Y. & Benbow, E.M. (2017) Predictable weathering of puparial hydrocarbons of necrophagous flies for determining the postmortem interval: a field experiment using *Chrysomya rufifacies*. *International Journal of Legal Medicine*, **131**, 885–894.
- Zhu, G.H., Xu, X.H., Yu, X.J., Zhang, Y. & Wang, J.F. (2007) Puparial case hydrocarbons of *Chrysomya megacephala* as an indicator of the postmortem interval. *Forensic Science International*, **169**, 1–5.
- Zhu, G.H., Yu, X.J., Xie, L.X., Luo, H., Wang, D., Lv, J.Y. & Xu, X.H. (2013) Time of death revealed by hydrocarbons of empty puparia of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae): A field experiment. *PLoS ONE*, **8**, e73043.
- Zubakov, D., Boersma, A.W.M., Choi, Y., van Kuijk, P.F., Wiemer, E.A.C. & Kayser, M. (2010) MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation. *International Journal of Legal Medicine*, **124**, 217–226.

Anhang

**Erklärung zu den Autoren-/Autorinnenanteilen an den einzelnen Kapiteln
der Promotionsarbeit und die dazugehörigen Kapitel**

Erklärung zu den Autorenanteilen an der Publikation:

Of pigs and men – comparing the development of *Calliphora vicina* (Diptera:
Calliphoridae) on human and porcine tissue

Status (*submitted, under review, in revision, accepted*): *accepted*

Ab *accepted* Name der Zeitschrift: International Journal of Legal Medicine

Beteiligte AutorInnen (Namen mit eindeutigen Kürzeln):

Bernhardt, Victoria (VB)

Schomerus, Christof (CS)

Verhoff, Marcel A. (MAV)

Amendt, Jens (JA)

Was hat der Promovierende bzw. was haben die Koautoren beigetragen?^{2*3}**(1) zu Entwicklung und Planung**

VB: 65 %

CS: 5 %

JA: 30 %

(2) zur Durchführung der einzelnen Untersuchungen und Experimente

VB: 100 %

(3) zur Erstellung der Datensammlung und Abbildungen

VB: 100 %

(4) zur Analyse und Interpretation der Daten

VB: 70 %

JA: 30 %

(5) zum Verfassen des Manuskripts

VB: 70 %

CS: 5 %

MAV: 5 %

JA: 20 %



Of pigs and men—comparing the development of *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) on human and porcine tissue

V. Bernhardt^{1,2} · C. Schomerus³ · M. A. Verhoff¹ · J. Amendt¹

Received: 30 August 2016 / Accepted: 20 October 2016 / Published online: 15 November 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract Over the last decades, studies on juvenile development of forensically important Diptera were performed by using non-human tissues (e.g., beef liver) as a nutrition medium. Such developmental data are used as a reference in determining the age of juvenile necrophagous insects sampled from a human body and thereby to estimate the minimum postmortem interval (PMI_{min}). Despite the acceptance of these studies in the forensic community, some might ask whether such data appropriately reflect the growth of blow flies on human tissue. We, therefore, studied larval growth rates and development times of *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) on human muscle tissue as well as on pork loin, pork liver, and minced pork at 25 °C. Larval growth rates were significantly ($p < 0.001$) slower on pork loin and pork liver compared to human muscle tissue. Nonetheless, the time at which the examined developmental landmarks “post-feeding larvae,” “pupae,” and “adult fly” were reached was similar for all tissues, with significant delays in first fly eclosion only for specimens reared on pork loin ($p = 0.027$) and pork liver ($p = 0.036$). Our results highlight the fact that not all porcine tissues are similarly suitable for producing sound growth data

for necrophagous Diptera. At present, we recommend the use of minced pork as a non-human nutrition medium, since our results show no developmental differences on this diet compared to human tissue.

Keywords Larval development · Forensic entomology · Postmortem interval · Food source

Introduction

The main task of forensic entomology is the estimation of the minimum postmortem interval, which is mainly based on developmental data for necrophagous blow flies [1, 2, 7, 18].

The required reference data for an age estimation of blow fly larvae are collected in the laboratory by means of growth studies performed under controlled conditions. Since there are no distinct recommendations, a large variety of different non-human substrate tissues such as pork liver, lean pork, beef liver, mixed (beef/pork) minced meat, or lamb liver are used for such studies [3, 4, 12, 17, 26].

In recent years, several publications have focused on food quality as an additional biotic factor for plasticity in larval growth and development [9, 11, 13, 22, 23]. Clark et al. [9] observed that larvae of the blow fly *Lucilia sericata* grew faster when reared on lung and heart in comparison to liver. El-Moaty and Kheirallah [13] presented a similar amount of variation for the same species when fed with brain, lung, liver, kidney, heart, meat, or intestine. These findings were confirmed by a study from Kaneshrajah and Turner [23] showing that different types of tissue also affect the development of another blow fly, *Calliphora vicina*.

In addition, not only the type of tissue can effect larval growth and development time of blow flies, but also the animal species from which the tissues were taken. The results

✉ V. Bernhardt
bernhardt@med.uni-frankfurt.de

¹ Institute of Legal Medicine, University Hospital Frankfurt am Main, Goethe-University, Kennedyallee 104, 60596 Frankfurt am Main, Germany

² Department of Aquatic Ecotoxicology, FB Biowissenschaften, Goethe-University, Max-von-Laue-Str. 13, 60438 Frankfurt am Main, Germany

³ Dr. Senckenbergische Anatomie, University Hospital Frankfurt am Main, Goethe-University, Theodor-Stern-Kai 7, 60590 Frankfurt am Main, Germany

of Clark et al.'s [9] study revealed that *L. sericata* larvae in general developed faster on a porcine diet than on bovine tissue and show that larvae wandered 30 h earlier from their diet when feeding on lung or heart compared to liver. However, Hamden and Tomberlin [19] partly reported contrary results for the black soldier fly *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae): larvae reared on beef developed faster than those reared on pork. If such differences exist, some might ask whether growth studies using animal tissues appropriately mirror blow fly development on human tissues [9]. This question could be a major critical point when introducing entomological evidence into court. In 2009, a US-National Research Council [10] report indicated the need for progress in many forensic sciences in order to increase accuracy and meet the Daubert standard, a court standard used to evaluate scientific information in court, either as evidence or in its interpretation. Tomberlin et al. [30] acted on this proposal by discussing several opportunities for improvement in forensic entomology. While they also mention the effect caused by the type of tissue consumed by fly larvae during development, they, interestingly, focus only on the possible presence of ante-mortem toxins as a source of variation in growth and do not mention any tissue-specific characteristics as a possible cause of error. Clark et al. (2006) pointed out that larvae grew more rapidly on pig than on cow, and that "*it is possible that further differences in growth rate and size of larvae will also occur between human and pig tissue.*" However, until today, no study examines this potential caveat and whether possible differences are of forensic relevance.

Hence, we investigated for the first time larval growth and development of the forensically relevant blow fly *C. vicina* on human muscle tissue in comparison with common porcine tissues like liver, minced meat, and lean muscle (pork loin) to assess the comparability of these nutritional substrates. The main aim of the present study was to assess the use of animal tissue as a surrogate for human tissue, but we also discuss the need for a standardization of the substrates used in growth studies.

Material and methods

Fly colony

Adult *C. vicina* were maintained on sugar and water *ad libitum* in 36 cm × 57 cm × 38 cm rearing cages at room temperature and 12:12 L:D. Once in a week, a piece of beef liver was provided as a protein source and oviposition medium.

Human and porcine tissues

Human muscle tissue was obtained from five different body donors. The body donors had signed a testamentary

disposition stating that their bodies could be used for medical education and research. Approval of the ethical review committee was, therefore, not necessary. Prior to tissue removal, the body donors were frozen at -20°C and defrosted for tissue removal just before the start of the experiment. We removed parts of the musculus gluteus maximus or musculus quadriceps femoris, depending on the body's condition.

As porcine tissues, we used minced pork, pork loin, and pork liver from five different pigs. All porcine tissues were obtained from the same butcher to guarantee that the tissue types originated from single specimens. All tissues were stored at -20°C and defrosted just before the start of the experiment.

Experimental design

Fresh beef liver (~10 g) was supplied for oviposition. To ensure that all resulting larvae had the same age, oviposition was restricted to 3 h. Batches of approx. 100 eggs were transferred to a small piece (~2 g) of the relevant type of tissue. The eggs on the tissues were incubated (LinTek MKKL 600/2, Germany) at 25°C ($\pm 0.5^{\circ}\text{C}$) for 20 h (± 0.5 h). After hatching, a group of ten larvae were transferred to 10 g of the tissue of interest and placed in a 6.5-cm high plastic cup. The cup was put in a plastic box, whose ground was covered with a thin layer of sawdust as a pupation medium. The plastic boxes were locked with a corresponding lid (supplied with small holes for ventilation) and placed in an incubator at 25°C . Per tissue sample (five different human individuals, five pork loin samples, five pork liver samples, five minced pork samples from five different pigs), six of these boxes were created for each relevant tissue type to represent one run. Altogether, three runs were conducted, leading to a total of 3600 larvae (900 per tissue type; 180 for each tissue sample).

Larval length was measured 48, 72, and 96 h (± 1.5 h oviposition time accuracy) after oviposition. All larvae of one randomly chosen box per tissue sample and tissue type were killed with boiling water and measured by means of a geometrical micrometer at every sampling time. The remaining boxes were used to establish the minimum time to reach the developmental landmarks by recording the first post-feeding larva, pupa, and adult fly in sequent intervals of 8 and 16 h. By doing so, an accuracy to the day (± 12 h) was achieved when estimating the timing of the different developmental landmarks. Hence, we focused on deviations bigger than the natural noise of development, which is relevant for establishing forensic reports about the minimum post-mortem interval based on the developmental landmarks of forensically relevant blow flies.

Median larval length and mean development times were calculated for every tissue type. All data were analyzed by the non-parametric Kruskal-Wallis test and pairwise comparison by means of IBM SPSS Statistics (IBM Corp. Released

2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.).

Results

Larval length

Growth on pork loin and pork liver revealed significant differences in larval length at all three sampling times compared to human muscle tissue (Fig. 1). In contrast, growth on minced pork led to similar larval lengths as for growth on human muscle tissue.

Forty-eight hours after oviposition, larvae showed a median length of 8.0 mm when reared on human muscle tissue, while larvae reared on pork loin and pork liver were significantly smaller (7.0 and 7.2 mm, respectively; Fig. 1a). Pairwise comparison revealed that larvae reared on human muscle tissue were 0.8–1.0 mm larger in median length compared to larvae reared on pork liver or pork loin ($p < 0.001$). Moreover, larvae reared on minced pork were significantly larger in median length (0.7–0.9 mm) than those reared on pork liver or pork loin ($p < 0.001$).

Seventy-two hours after oviposition, larvae on human muscle tissue showed a median length of 16.5 mm (Fig. 1b), revealing significant differences between the different tissue types ($p < 0.001$). Compared to pork loin and pork liver, larvae reared on human tissue were up to 3.5 mm larger in median length ($p < 0.001$). Larvae reared on minced pork were also significantly larger compared to specimens grown on pork loin and pork liver ($p < 0.001$). Even larvae reared on pork liver were 1.6 mm larger in median length compared to those reared on pork loin ($p < 0.001$).

Ninety-six hours after oviposition, larvae reared on human muscle tissue, as well as those reared on minced pork, reached a median length of 17.9 mm. Hence, larvae reared on human muscle tissue or minced pork were 0.6–1.1 mm larger in median length compared to those reared on pork liver (17.3 mm) or pork loin (16.8 mm). These differences were significant ($p < 0.001$) (Fig. 1c). Moreover, larvae reared on pork liver were significantly ($p < 0.002$) larger than those reared on pork loin.

Development times

The minimum times to reach the post-feeding stage and the pupal stage were not significantly different from each other (human tissue vs. pork loin, pork liver or minced pork) (Fig. 2). They ranged between 112.5 and 120.5 h (minced pork and pork loin). Depending on the tissue, specimens needed at least 163.7–170.9 h (human muscle tissue and pork loin) until the first pupation. First fly eclosion took place at significantly different times: specimens reared on human

muscle tissue or minced pork required at least an average time of 384.5 and 385.6 h to complete their development. Specimens reared on pork loin or pork liver needed, on average, at least 393.9 h or, respectively, 393.6 h. However, a statistically significant difference in time for fly eclosion was noticed only between the specimens on human muscle tissue and those on pork loin ($p = 0.027$) or pork liver ($p = 0.036$).

Discussion

The development of immature blow flies is affected by numerous factors that may sometimes even interact with each other, e.g., larval-mass temperatures [8], the quantity of a given food source [22, 31], and intra- or interspecific competition [28, 29]. By affecting the growth and development of blow flies, these factors have an impact on the age estimation of juvenile blow flies and, therefore, also on the linked estimation of the PMI_{min} . A so-far under-studied cause of developmental variation is the nutrition type and quality during the feeding stages. Past studies have mainly focused on toxicological factors causing variation, by analyzing the impact that certain drugs can have on the metabolism and growth of forensically relevant blow flies [16, 21]. Only recently, several authors have concluded not only that contaminated and modified food sources can influence the growth of certain species but also that different types of tissue and their related nutritional value are of relevance [9, 22].

There are many types of tissue, and also animal species, in use for rearing fly larvae in developmental studies or after sampling insect evidence from a dead body [12, 17, 26]. However, in the majority of studies, the domestic pig (*Sus scrofa domestica*) is the species of choice, and several different pork tissues are commonly used as substrates [3, 4, 33]. Byrd and Tomberlin [5] state that insect growth on pork does not differ significantly from insect development on human tissue, but, unfortunately, do not include any references or cite any studies to support this statement. We are, in fact, not aware of any published study that demonstrates the use of porcine tissues as a suitable surrogate for human tissue.

We, therefore, analyzed the growth of the forensically relevant blow fly *Calliphora vicina* on human muscle tissue and three different types of porcine tissues usually used in forensic entomology studies.

Our results concerning larval growth on liver are consistent with those from other studies, such as Clark et al. [9], Kaneshrajah and Tumer [23], and El-Moaty and Kheirallah [13]. Kaneshrajah and Tumer [23] for example showed that 4-day-old *C. vicina* larvae reared on liver were approx. 5 mm smaller compared to larvae reared on kidney and heart and approx. 9 mm smaller compared to larvae reared on lung. El-Moaty's and Kheirallah's [13] study revealed that 3-day-old *L. sericata* larvae reared on liver were at least approx.

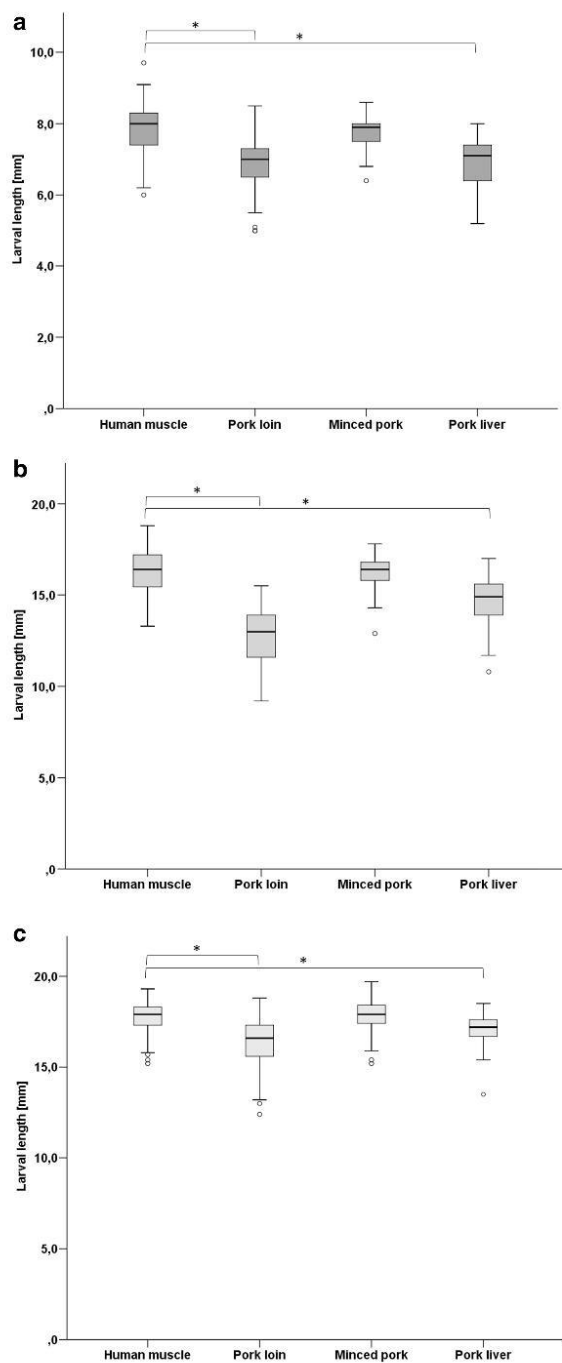


Fig. 1 Larval length [median in mm] of *C. vicina* 48 h (a), 72 h (b) and 96 h (c) after oviposition. Larvae reared on human muscle, pork loin, minced pork and pork liver at 25 °C; * $p < 0.001$

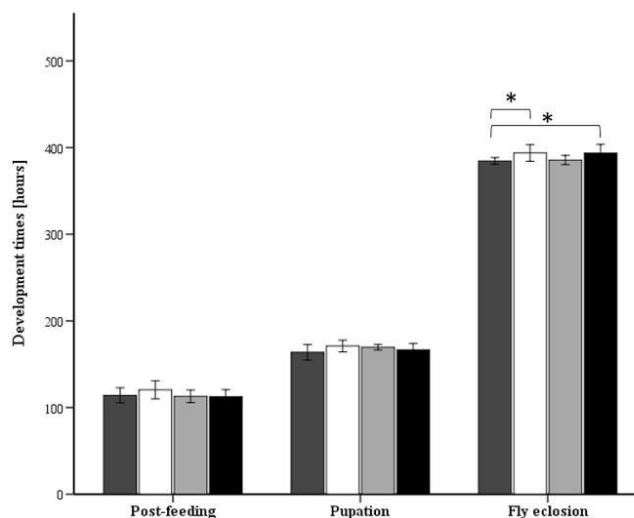
2 mm smaller compared to larvae reared on lung and brain. All of these studies conclude that feeding on liver, regardless from which animal species, results in delayed larval growth rates compared to feeding on tissues like brain and lung, or, as in our case, minced pork and human muscle. However, in the majority of the mentioned studies, as well as in the present study, the identified differences are not big enough to have an impact on the estimation of the PMI_{min} . An exemplary comparison of the larval length data 72 h after oviposition based on the isomegalen diagram of Reiter [27] revealed a difference of approx. 0.7 days between the specimens grown on human muscle versus pork loin. This would have no influence on the PMI_{min} estimation in terms of narrowing down a day of colonization.

In our study, larvae feeding on human muscle compared to porcine muscle (pork loin) resulted in significant differences in larval length, although these two tissues do not differ in structure resp. texture, as do, for example, liver and minced pork. However, a look at the nutritional values of these tissues, as given in the National Nutrient Database for Standard References of the US Department of Agriculture (<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list>), reveals that pork loin has the lowest fat content, with 2.17 %, followed by pork liver, with 3.65 %, and minced pork, with 21.19 %. Information on the fat content of human muscle varies and seems to be muscle-, age- and gender-specific, as well as being dependent on the individual's state of health [24].

Therefore, the given data for fat content of human muscle tissues vary between 5 % [22, 24], 9 % [24, 25], and 19 % [14]. In our study, the fat content, based on National Nutrient Database for Standard References of the US Department of Agriculture, of the given tissues nevertheless correlated positively with larval growth. Low-fat pork loin generated the smallest larvae, followed by larvae reared on pork liver, whereas larvae reared on high-fat minced pork and human muscle were significantly larger. As Uvarov [32] has already pointed out, blow fly larvae are able to metabolize proteins into fat and store this fat in their fat-bodies as an energy source [32]. If larvae mainly feed on a fatty food source, they need less energy for the modification of proteins and have more energy left for growth [13]. Similar results to Uvarov's were shown for blow flies by Hobson [20], who describes cholesterol as an essential growth factor, as it is a structural component of cell membranes and serves as a precursor of the molting hormones for blow fly larvae [6, 20]. Hobson also argues that the quantity of natural fats and oils of a given food source correlates with cholesterol content of it [6, 20].

In this study, the development times of the larvae reared on human tissue and the different porcine tissues were quite homogenous at almost all stages of development. Solely the first eclosion of flies reared on pork loin and liver was delayed, with a statistically significant average delay of up to 9.4 h compared to flies reared on human tissue. However, a time span of 9.4 h seems forensically insignificant in terms of narrowing down a day of colonization. This result suggests that animal species or tissue type do not affect the development times (in the sense of reaching certain developmental landmarks like larval instars or the pupal stage), but rather

Fig. 2 Minimum times [mean \pm SD, in hours] required to reach three developmental landmarks represented by first post-feeding larvae, first pupation, and first fly eclosion of *C. vicina*, reared on human muscle (dark gray), pork loin (white), minced pork (light gray) and pork liver (black) at 25 °C; * $p < 0.05$



only have an effect on larval growth and, therefore, size. Indeed, as long as the larvae obtain all necessary nutritional components to complete their development, such as fat, growth seems to be only a secondary target during juvenile development [15].

In conclusion, most importantly, we found no forensic relevant differences between human-raised fly specimen and specimen grown on minced pork meat. Larvae reared on tissues with low fat content revealed delayed larval growth rates, and the larvae did not reach their maximal length until the beginning of the post-feeding stage. The development times, however, remained unaffected, apart from a few hours variation in the eclosion time of the first fly. At the present time, we, therefore, recommend the use of minced pork as a non-human nutrition medium, since our results show no developmental differences on this tissue compared to human tissue. While this is the case for larval development on muscle tissue, future work may consider investigating larval development on other human tissues like brain, lung, or tongue, as larvae commonly feed on these tissues as well as on muscle. However, access to donor tissue for such studies is rather limited. This clearly illustrates the need for an appropriate surrogate tissue for establishing developing data of forensically important insects.

Acknowledgments We thank Klaus Grdusak, Miriam Saulich, Lucy Taube, Stephanie Plenzig, and Peter Kömpel for their support in sampling human and porcine tissues and Kwankamol Limsopatham for helping to record the growth data.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

References

- Amendt J, Campobasso CP, Gaudry E et al (2007) Best practice in forensic entomology—standards and guidelines. *Int J Legal Med* 121:90–104
- Amendt J, Richards CS, Campobasso CP et al (2011) Forensic entomology: applications and limitations. *Forensic Sci Med Pathol* 7:379–392
- Ames C, Turner B (2003) Low temperature episodes in development of blowflies: implications for postmortem interval estimation. *Med Vet Entomol* 17:178–186
- Byrd JH, Allen JC (2001) The development of the black blow fly, *Phormia regina* (Meigen). *Forensic Sci Int* 120:79–88
- Byrd JH, Tomerberlin JK (2010) Laboratory rearing of forensic insects. In: Byrd JH, Castner JL (eds) (Hrsg) *Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations*, 2nd edition. CRC Press, Boca Raton, pp S 177–201
- Canavoso LE, Jouni ZE, Karnas KJ et al. (2001) Fat metabolism in insects I. *Annu Rev Nutr*. 23–46
- Catts EP, Goff ML (1992) Forensic entomology in criminal investigations. *Annu Rev Entomol* 37:253–272
- Charabidze D, Bourel B, Gosset D (2011) Larval-mass effect: characterisation of heat emission by necrophagous blowflies (Diptera: Calliphoridae) larval aggregates. *Forensic Sci Int* 211:61–66
- Clark K, Evans L, Wall R (2006) Growth rates of the blowfly, *Lucilia sericata*, on different body tissues. *Forensic Sci Int* 156:145–149
- Committee on Identifying the Needs of the Forensic Sciences Community NRC (2009) *Strengthening forensic science in the United States: a path forward*. Natl Acad Press
- Day DM, Wallman JF (2006) Influence of substrate tissue type on larval growth in *Calliphora augur* and *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae). *J Forensic Sci* 51:657–663
- Donovan SE, Hall MJR, Turner BD, Moncrieff CB (2006) Larval growth rates of the blowfly, *Calliphora vicina*, over a range of temperatures. *Med Vet Entomol* 20:106–114
- El-Moaty ZA, Kheirallah AEM (2013) Developmental variation of the blow fly *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) (Diptera: Calliphoridae) by different substrate tissue types. *J Asia Pac Entomol* 16:297–300
- Fischer MA, Nanz D, Shimakawa A et al (2013) Quantification of muscle fat in patients with low back pain: comparison of multi-echo MR imaging with single-voxel MR spectroscopy. *Radiology* 266:555–563
- Forster J, Hirst AG, Woodward G (2011) Growth and development rates have different thermal responses. *Am Nat* 178:668–678
- Goff ML, Omori AI, Goodbrod JR (1989) Effect of cocaine in tissues on the development rate of *Boettcherisca peregrina* (Diptera: Sarcophagidae). *J Med Entomol* 26:91–93
- Grassberger M, Reiter C (2001) Effect of temperature on *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) development with special reference to the isomegalen- and isomorphen-diagram. *Forensic Sci Int* 120:32–36
- Greenberg B, Kunich JC (2002) *Entomology and the law: flies as forensic indicators*. Cambridge University Press
- Hamden LM, Tomberlin JK (2016) Effects of temperature and diet on black soldier fly, *Hermetia illucens* (L.) (Diptera: Stratiomyidae), development. *Forensic Sci Int* 266:109–116
- Hobson RP (1935) On a fat-soluble growth factor required by blowfly larvae: identity of the growth factor with cholesterol. *Biochem J* 29:2023–2026
- Introna F, Campobasso CP, Goff ML et al (2001) Entomotoxicology. *Forensic Sci Int* 120:42–47
- Ireland S, Turner B (2006) The effects of larval crowding and food type on the size and development of the blowfly, *Calliphora vomitoria*. *Forensic Sci Int* 159:175–181
- Kaneshrajah G, Turner B (2004) *Calliphora vicina* larvae grow at different rates on different body tissues. *Int J Legal Med* 118:242–244
- Kumar D, Karampinos DC, MacLeod TD et al (2014) Quadriceps intramuscular fat fraction rather than muscle size is associated with knee osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil* 22:226–234
- Marcon M, Berger N, Manoliu A et al (2016) Normative values for volume and fat content of the hip abductor muscles and their dependence on side, age and gender in a healthy population. *Skeletal Radiol* 45:465–474

26. Niederegger S, Wartenberg N, Spiess R, Mall G (2013) Influence of food substrates on the development of the blowflies *Calliphora vicina* and *Calliphora vomitoria* (Diptera, Calliphoridae). *Parasitol Res* 112:2847–2853
27. Reiter C (1984) Zum Wachstumsverhalten der Maden der blauen Schmeißfliege *Calliphora vicina*. *Rechtsmedizin* 91:295–308
28. Saunders DS, Bee A (1995) Effects of larval crowding on size and fecundity of the blow fly, *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae). *Eur J Entomol* 92:615–622
29. Shiao S-F, Yeh T-C, Baumgartner DL et al (2008) Larval competition of *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya rufifacies* (Diptera: Calliphoridae): behavior and ecological studies of two blow fly species of forensic significance. *J Med Entomol* 45:785–799
30. Tomberlin JK, Mohr R, Benbow ME et al (2011) A roadmap for bridging basic and applied research in forensic entomology. *Annu Rev Entomol* 56:401–421
31. Ulyett GC (1950) Competition for food and allied phenomena in sheep-blowfly populations. *Philos Trans R Soc London Ser B, Biol Sci* 234:77–174
32. Uvarov BP (1929) Insect nutrition and metabolism. *Trans R Entomol Soc London* 76:255–343
33. Wells JD, Kurahashi H (1994) *Chrysomya megacephala* (F.) development: rate, variation and the implications for forensic entomology. 45:303–309

Erklärung zu den Autorenanteilen an der Publikation:

Same, same but different! – matching entomological traces to a human food source
by stable isotope analysis

Status (*submitted, under review, in revision, accepted*): *accepted*

Ab *accepted* Name der Zeitschrift: International Journal of Legal Medicine

Beteiligte AutorInnen (Namen mit eindeutigen Kürzeln):

Bernhardt, Victoria (VB)

Holdermann, Thomas (TH)

Scheid, Nicole (NS)

Schäfer, Thomas (TS)

Verhoff, Marcel A. (MAV)

Amendt, Jens (JA)

Was hat der Promovierende bzw. was haben die Koautoren beigetragen?**(1) zu Entwicklung und Planung**

VB: 70 %

JA: 30 %

(2) zur Durchführung der einzelnen Untersuchungen und Experimente

VB: 65 %

TH: 20 %

NS: 10 %

TS: 5 %

(3) zur Erstellung der Datensammlung und Abbildungen

VB: 100 %

(4) zur Analyse und Interpretation der Daten

VB: 100 %

(5) zum Verfassen des Manuskripts

VB: 80 %

JA: 15 %

MAV: 5 %



Same, same but different!—matching entomological traces to a human food source by stable isotope analysis

Victoria Bernhardt^{1,2} · Thomas Holdermann³ · Nicole Scheid³ · Thomas Schäfer³ · Marcel A. Verhoff¹ · Jens Amendt¹

Received: 7 September 2017 / Accepted: 27 November 2017
 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2017

Abstract

Blow flies are important tools in forensic entomology, as they feed and develop on human bodies. This fact can be used to estimate the minimum post mortem interval (PMI_{min}), by classifying the age of the immature stages found on corpses. The capacity to also be able to classify the age of adult flies, or even empty puparia, could increase the timeframe for a PMI_{min}. However, the association of older developmental stages, such as adult flies or their empty cases, with a human cadaver may be challenged, as such specimens could stem from another food source. Analyzing the stable carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) isotopes in such specimens could be helpful here, as the isotope signatures reflect those of the food sources. We compared the $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ signatures of tissue from humans and 12 additional species by elemental analyzer-isotope ratio mass spectrometry (EA-IRMS). We did the same for adult flies and empty puparia of the blow fly *Lucilia sericata*, which were derived from juvenile stages developed on tissues from the mentioned species. The isotope signatures for the adult flies and their empty puparia linearly mirrored the isotope signatures for the respective tissues on which they developed as larvae. Results such as these are useful to indicate the flies' nutritional history, but they do not provide the same kind of evidence that a DNA analysis would. As individual dietary habits, global distribution and environmental effects can influence isotope ratios, we strongly recommend to analyzing entomological traces and muscle tissues of potential donors or for other food sources.

Keywords Food source · Forensic entomology · *Lucilia sericata* · Stable isotopes

Introduction

Necrophagous insects like blow flies (Diptera: Calliphoridae) feed and develop on decaying tissues from animal cadavers and human corpses [1, 2] and are, thus, an important part of an invertebrate decomposition community [3–5]. Adult blow flies are able to detect a cadaver through olfactory stimuli and oviposit on it, often soon after death. Subsequent hatching of the larvae and their development and metamorphosis into

an adult fly is a function of ambient temperature and the fly's species. Knowledge of these developmental stages is used in forensic entomology to estimate the age of the immature stages of blow flies sampled from a dead body and its surroundings. The ability to estimate the age of larval blowflies is thus a powerful tool for the estimation of the minimum time since death [2, 6]. Once the PMI exceeds the juvenile development of the first colonizing wave, this method, however, becomes less accurate. Although empty puparia found at a crime scene can still indicate that this critical interval between colonization and eclosion has been exceeded, it can no longer be determined when the first colonizers finished their development. Recently, however, some promising attempts have been undertaken in estimating the age (or degradation) of adult flies and their empty puparia [7–11]. The latter are very resistant and can remain preserved at a scene of death for up to several hundred years. Flies in indoor settings are often unable to leave such scenes, for example, through a tilted window, and can still be found months or years after they have died. Hence, estimating the age of these specimens can serve to

✉ Victoria Bernhardt
 bernhardt@med.uni-frankfurt.de

¹ Institute of Legal Medicine, University Hospital Frankfurt, Goethe-University, Frankfurt am Main, Germany

² Department of Aquatic Ecotoxicology, FB Biowissenschaften, Goethe-University, Frankfurt am Main, Germany

³ Forensic Science Institute, Central Analysis II, Federal Criminal Police Office, Wiesbaden, Germany

extend the window of time regarding the PMI_{min} , simply by adding the age of the adult fly or its empty puparia to the time needed for completion of metamorphosis and hatching as recent techniques in forensic entomology are targeting the age estimation of adult flies and the weathering of empty puparia as new tools for the analysis of the minimum time since death [7, 8, 10–13].

However, despite the mentioned progress in aging such specimens, there is still one serious problem left. It makes little difference to blow flies whether the cadaver they oviposit on is human or that of an animal, and thus, to date, only the feeding larval stages on and around the cadaver can be assigned to a particular corpse with certainty, as the existence of these larvae depends on the very recent presence of a cadaver, i.e., the one on site. In contrast, the association of older developmental stages, such as adult flies or their empty cases, with a decomposing human cadaver at a crime scene may be challenged, due to the possibility that such specimens may have stemmed from another, already decomposed and disappeared, food source and not from the corpse in question [14]. Adult flies found inside an apartment could also have been just come from outside, being attracted by the corpse or, indeed, developed on the corpse in question. A similar problem arises in the case of outdoor scenarios where empty puparial cases are found. As these puparial cases can persist months or even years at a scene, they can stem from a former animal carcass and not from the corpse in question. Marchetti et al. [15] stated that they were able to extract human DNA from empty puparial cases and therefore linked those cases to a particular corpse, in our opinion, this method is too susceptible for external contamination in case work and therefore not evidential for the development of those stages on a particular corpse.

The ratios of stable carbon and nitrogen isotopes and their analysis are known to be a convenient tool for the analysis of food webs in biocenoses for achieving information about dietary habits in ecological systems [16, 17]. While the carbon ratio ($^{13}C/^{12}C$, reported as $\delta^{13}C$ value) gives information about the type of plants that are preferentially consumed (C_3 -, C_4 -, and/or CAM-plants), due to different photosynthetic pathways [18]; the nitrogen ratio ($^{15}N/^{14}N$, reported as $\delta^{15}N$ value) gives information about the trophic level, as an average enrichment of about + 3.0‰ along the food chain can be determined [19]. The nitrogen values for modern humans (analyzed in hair) range between 5.91–10.66‰ ($\delta^{15}N$) [20, 21], depending on a vegan, vegetarian, or omnivore lifestyle, while the carbon values basically depend on the consumed plant materials and range between – 16.6 and – 21.6‰ ($\delta^{13}C$) [20, 21]. Both values are heavily dependent on the global spatial distribution of humans [20], but due to humans' largely omnivore diets, they often represent the top of their respective trophic system [22].

Based on “you are what you eat (plus a few per mille),” it is a common practice to reconstruct the nutritional history of organisms by means of stable isotope analysis [23, 24]. Therefore, the idea that adult blow flies and their corresponding empty puparial cases could reveal their development on human or animal tissues by way of stable carbon and nitrogen isotopes ratios seems to be a promising way of assigning such entomological samples from a scene of death to a certain food source, like human tissue, and, eventually, of extending the possible PMI_{min} based on entomological estimations.

Materials and methods

Fly stocks

An established stock of the forensically important blow fly *Lucilia sericata* were kept in 57 × 38 × 36 cm rearing cages at the Institute of Legal Medicine. The stock was maintained on sugar and water ad libitum at room temperature (20 ± 2 °C) and a 12:12 light: dark photoperiod. Once a week, a piece of beef liver (~5 g) was provided as a protein source and oviposition medium.

Human and animal tissues

Human muscle tissue was obtained from ten human bodies. The body donors had signed a testamentary disposition stating that their bodies could be used for medical education and research purposes. The bodies were frozen at – 20 °C and defrosted for tissue removal. Parts of the *Musculus gluteus maximus* or, depending on the body's condition, the *Musculus quadriceps femoris* were taken. Tissues from three roe deer (*Capreolus capreolus*) and three wild boars (*Sus scrofa*) were acquired in three different butcher's shops to ensure that the meat originated from three different specimens of each type. The three rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), five squirrels (*Sciurus vulgaris*), and four shrews (*Crocidura suaveolens*) that were also investigated were roadkill. Three different beef samples (*Bos primigenius taurus*), three fish specimens (*Theragra chalcogramma*), three different pork samples (*Sus scrofa domestica*), and three chicken samples (*Gallus gallus domesticus*) were bought in different supermarkets. The Institute of Veterinary Pathology at the Justus-Liebig University Gießen (Germany) kindly provided cat (*Felis silvestris catus*) and dog (*Canis lupus familiaris*) muscle tissue from three different individuals of each. Muscle tissue from three sheep (*Ovis gmelini aries*) was kindly provided by the central research facility at the University Hospital Frankfurt/Main, Germany.

Sample preparation of adult *L. sericata* and their empty puparial cases

From each tissue sample, approximately 1 g was kept for isotope analysis and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Fresh beef liver ($\sim 10\text{ g}$) was supplied for oviposition for 3 h. Batches of approximately 50 eggs were transferred to a small piece ($\sim 2\text{ g}$) of the relevant type of tissue. Eggs on the tissues were incubated (LinTek MKKL 600/2, Germany) at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$) for 20 h ($\pm 0.5\text{ h}$). After hatching, groups of 10 larvae were transferred to 5–10 g of the tissue of interest and placed in a 6.5 cm tall plastic cup. The cup was put in a plastic box, and the bottom of which was covered with a thin layer of sawdust as a pupation medium. The plastic boxes were locked with a corresponding lid (supplied with small holes for ventilation) and placed in an incubator at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Per tissue sample (see above), three such boxes were created. After eclosion of the adult flies, the boxes were put into a freezer ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) for at least 30 min to kill the flies. Ten dead adult flies and ten empty puparial cases were separately transferred into small glass jars. Entomological samples and tissue samples were each lyophilized in a Lyovac GT 2-E (SRK Systemtechnik GmbH, Riedstadt, Germany) for 48 h. After drying, the samples were individually ground and homogenized in a ball mill (Retsch MM 2000, Haan, Germany). In addition, single flies and single puparia were also dried and ground to show that even the amount of material gained from only one specimen suffices for an analysis.

EA/IRMS analysis

For the elemental analysis, 340–380 μg of powdered flies, respectively, 420–440 μg of powdered puparia or powdered tissue, were weighed in tin capsules by means of an ultramicrobalance (UMT5, equipped with UMT5 Comparator, Mettler Toledo, Gießen, Germany) in triplicate. The samples were flash combusted on a Flash EA 1112 elemental analyzer coupled online to a Delta V plus isotope ratio mass spectrometer via a ConFlo IV interface (all Thermo Fisher Scientific, Bremen/Germany). The working standard gases and the in-house standards (peptone and acetaminophen; Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) were calibrated by using international standards. The international standards were V-PDB (Vienna-Pee Dee Belemnite) for $\delta^{13}\text{C}$ and AIR for $\delta^{15}\text{N}$. These are defined as 0‰ on the respective δ -scale. For nitrogen, the standards USGS40 and USGS43 were used, while, for carbon, the standards IAEA-CH-6 and IAEA-CH-7 were used. Acetanilide (Merck, Darmstadt, Germany) and synthetically produced chitin (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) were used as control samples to routinely check the accuracy and reproducibility of the system. The measurement uncertainty (standard deviation of repeated measurements) was $\pm 0.14\text{‰}$ for $\delta^{13}\text{C}$ and $\pm 0.22\text{‰}$ for $\delta^{15}\text{N}$. The raw values were blank-corrected, and the weighed amount was adapted to the linearity

range of the instrument. Drift was checked by measuring the control sample, acetanilide, at the beginning, the end, and throughout the sequence after nine unknown samples.

Stable isotope ratios were expressed in per mille [‰] according to the following formula:

$$\delta X = \left[\frac{(R_{\text{Sample}} - R_{\text{Standard}})}{R_{\text{Standard}}} \right] \times 1000$$

where X represents the heavier isotope (^{13}C or ^{15}N) and R the ratio between heavier isotope and lighter isotope, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ or $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, for example.

The average enrichment between adult fly or empty puparium sample and diet were calculated in the following way:

$$\Delta X = \delta X_{\text{Flies/Puparia}} - \delta X_{\text{Diet}}$$

Statistical analysis

Mean values and standard deviations were calculated and plotted in graphs (Excel, Microsoft Office; SPSS 22, IBM). Linear relationships between adult flies or empty puparia and diets were tested and plotted by means of SPSS 22 (IBM, Ehningen, Germany).

Results

Isotope ratios of investigated human and animal muscle tissues

Altogether, we analyzed and compared the $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values for 14 different host or food species (13 terrestrial; 1 marine) and could demonstrate 14 distinct, definable isotope ratios (Fig. 1 and Table 1). Apart from the marine fish samples, human muscle tissues showed the highest $\delta^{15}\text{N}$ value with 8.74‰ ($\pm 0.7\text{ SD}$) and an average $\delta^{13}\text{C}$ value of -22.66‰ ($\pm 0.56\text{ SD}$). These values are comparable to those published in the literature [20, 25, 26] with regard to tissue effects [24, 27]. Dogs and cats revealed the isotope ratios most similar to those for humans (Fig. 1a). Three specimens (1 boar and 2 cows) had $\delta^{13}\text{C}$ values indicating a mixed C_3/C_4 -plant diet (Fig. 1 and Table 1), according to Schoeninger [22], as they are more positive than -21.0‰ in their $\delta^{13}\text{C}$ values.

Isotope signatures of adult *L. sericata* (Diptera: Calliphoridae) and their empty puparia as a mirror of their food source

Adult *L. sericata* reflected the isotope signatures of the tissue they developed on as larvae (Fig. 1). The proportions of the muscle tissues to each other were reflected in the adult flies and showed a linear relationship ($R^2 = 0.810$ for $\delta^{15}\text{N}$; $R^2 =$

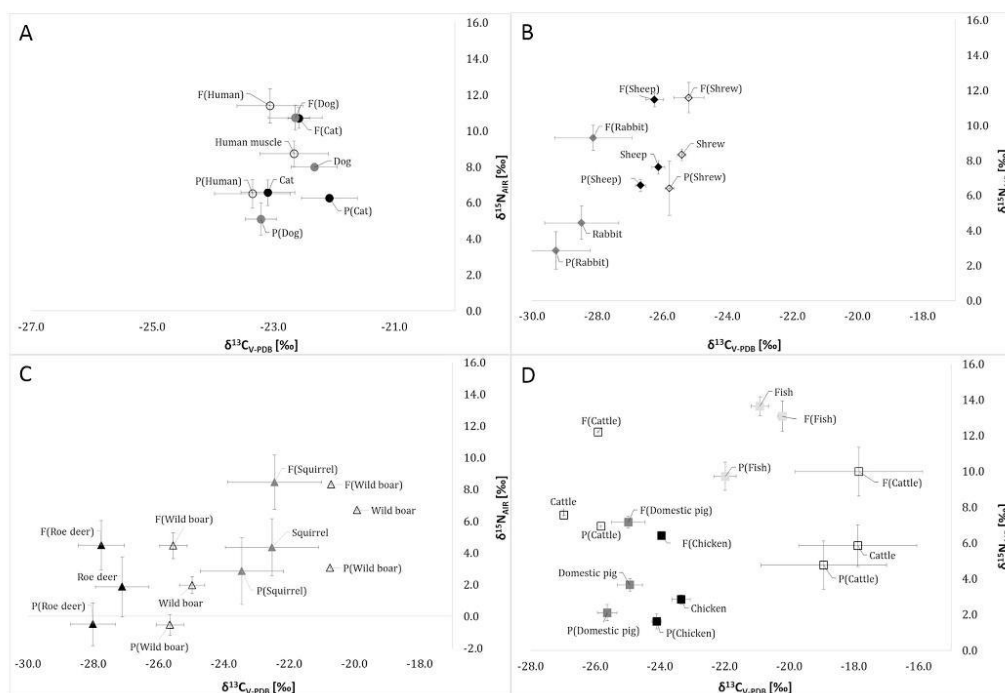


Fig. 1 Mean $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ isotope signatures ($\text{‰} \pm$ standard deviation) for different animal muscle tissues, adult *Lucilia sericata*, and their empty puparia, which developed on a respective tissue. Each group (tissue, fly (F) and puparia (P) samples) is represented by the same symbol. **a** Human (open circle), cat (black circle), and dog (gray circle) samples. **b** Shrew

(open rhombus), sheep (black rhombus), and rabbit (gray rhombus) samples. **c** Wild boar (open triangle), roe deer (black triangle), and squirrel (gray triangle) samples. **d** Cattle (open square), chicken (black square), domestic pig (dark gray square), and fish (light gray square) samples

Table 1 Mean carbon and nitrogen isotope signatures (\pm SD) for each tissue type

	<i>n</i>	$\bar{\delta}^{15}\text{N}$	SD	$\bar{\delta}^{13}\text{C}$	SD
Boar (C_3)	2	1.97	± 0.54	-24.98	± 0.39
Boar (C_3/C_4)	1	6.71	± 0.00	-19.92	± 0.00
Cat	3	6.24	± 0.18	-22.07	± 0.46
Cattle (C_3)	1	6.92	± 0.00	-25.83	± 0.00
Cattle (C_3/C_4)	2	5.85	± 1.17	-17.88	± 1.83
Chicken	3	2.84	± 0.25	-23.35	± 0.28
Dog	3	7.99	± 0.22	-22.32	± 0.38
Domestic pig	3	3.65	± 0.35	-24.93	± 0.39
Fish	3	13.64	± 0.53	-20.91	± 0.27
Human muscle	10	8.74	± 0.70	-22.66	± 0.56
Rabbit	3	4.43	± 0.95	-28.48	± 1.14
Roe deer	3	1.86	± 1.90	-27.11	± 0.82
Sheep	3	7.62	± 0.38	-26.12	± 0.20
Shrew	4	8.33	± 0.33	-25.40	± 0.13
Squirrel	5	4.35	± 1.80	-22.53	± 1.42

0.960 for $\delta^{13}\text{C}$ (Fig. 2a, b). They showed an overall enrichment of $+3.23 (\pm 1.35 \text{ SD}) \text{‰}$ of $\Delta^{15}\text{N}$ and a slight depletion $-0.2 (\pm 0.4 \text{ SD}) \text{‰}$ of $\Delta^{13}\text{C}$. However, as reported in Table 2, there are some exceptions: contrary to the usual “stepwise enrichment” from donor to consumer, flies which developed on the fish samples showed an average depletion of $\delta^{15}\text{N}$ of $-0.56 (\pm 0.67 \text{ SD}) \text{‰}$. The highest enrichment was observed between cattle samples and flies with $+4.51 (\pm 0.56 \text{ SD}) \text{‰}$. The enrichment between human muscle and flies amounted to $+2.65 (\pm 0.83 \text{ SD}) \text{‰}$ of $\Delta^{15}\text{N}$ and leads to an average $\delta^{15}\text{N}$ value of $11.38 (\pm 0.95 \text{ SD}) \text{‰}$ and an average $\delta^{13}\text{C}$ value of $-23.05 (\pm 0.54 \text{ SD}) \text{‰}$.

Similar results, reflecting of the proportions of the tissue, were also achieved for the empty puparial cases of *L. sericata* (Fig. 1) and revealing a linear relationship ($R^2 = 0.836$ for $\delta^{15}\text{N}$; $R^2 = 0.987$ for $\delta^{13}\text{C}$) (Fig. 2a, b). However, in contrast to the adult flies, we observed an average depletion of $\Delta^{15}\text{N}$ of $-1.74 (\pm 1.18 \text{ SD}) \text{‰}$ and an average depletion of $-0.82 (\pm 0.2 \text{ SD}) \text{‰}$ of $\Delta^{13}\text{C}$ for puparial cases compared to the tissues. The human isotope signature in empty puparia resulted in 6.49

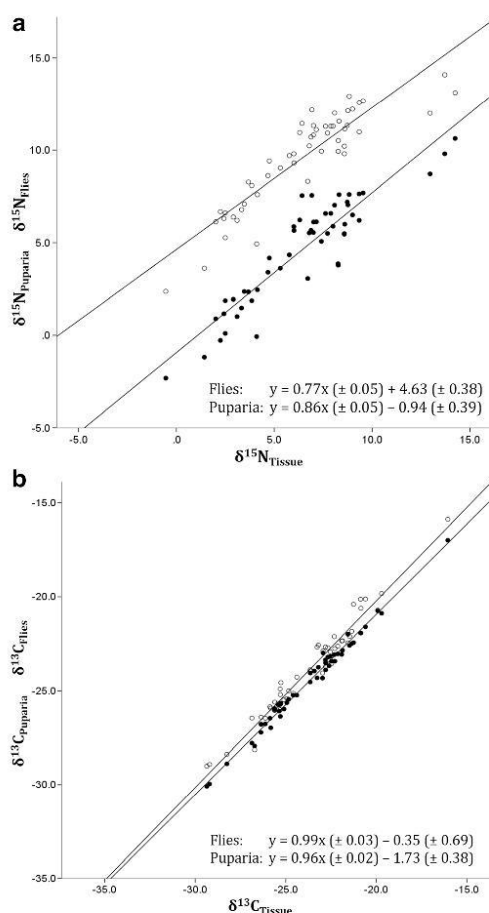


Fig. 2 Relationship between $\delta^{15}\text{N}$ (a) and $\delta^{13}\text{C}$ (b) isotope signatures for empty puparia (black dots) and flies (open circles) versus tissues. The nitrogen relationships (a) for puparia ($R^2 = 0.836$) and flies ($R^2 = 0.810$) and the carbon relationships (b) for puparia ($R^2 = 0.987$) and flies ($R^2 = 0.960$) were both linear

(± 0.81 SD) ‰ of $\delta^{15}\text{N}$ and -23.35 (± 0.63 SD) ‰. The $\Delta^{15}\text{N}$ depletion between human tissue and empty puparia was higher than the overall value at -2.24 (± 0.69 SD) ‰; the $\Delta^{13}\text{C}$ value was in the range of the overall depletion with -0.69 (± 0.32 SD) ‰ (Table 2).

Discussion

The use of stable carbon and nitrogen isotopes is the method of choice for the analysis of food webs and the reconstruction of nutritional histories of single individuals. Although carbon

signatures vary with the type of food consumed by the specimen in question, the trophic level is mainly represented by nitrogen signatures and should be more or less constant within an animal species due to its function in an ecosystem and its species-specific food preferences. According to the rule, “you are what you eat (plus a few per mille),” adult *L. sericata* blow flies and their empty puparial cases reflected the isotope ratios that were present in their original food source. First investigations concerning the determination of food sources of adult flies were made by Markow et al. (2000), who investigated wild-caught adult *Drosophila* and their hosts [28] and Heinrich et al. (2012) reared *Musca domestica* larvae on different laboratory diets based on bran, grass meal, yeast, malt, and milk powder, for example, but also on chicken, cattle manure, and meat-free household waste [29]. The authors of both studies support the idea of stepwise enrichment along the food chain from food source to consumer(s). In contrast to our results, Heinrich et al. observed an enrichment of $\Delta^{13}\text{C}$ in adult flies [29]. Our study instead revealed a depletion of $\Delta^{13}\text{C}$ in the majority of the samples. As the sample preparation was the same in both studies, the reason for the differences could be the diet of the larvae. McCutchan et al. [30] showed in their study that a diet which is initially depleted led to a lower trophic shift for carbon as an initially enriched diet. Lipids, which are found in muscle tissue, are depleted in ^{13}C compared to carbohydrates and proteins [30], which were mainly fed in the study of Heinrich et al. [29]. However, the general assumption to reveal a $\Delta^{13}\text{C}$ enrichment of $\sim +1$ ‰ between diet and consumer is actually no longer tenable as $\Delta^{13}\text{C}$ depletions or even no enrichments (± 0 ‰) are equally common in carbon fractionation [30, 31].

Such variations in trophic shifts can also be observed for nitrogen. Although, it has been widely accepted that nitrogen has an average enrichment of about $+3$ ‰ between food source and consumer [17, 24, 32, 33], it is more likely to reveal values which range between $+1$ and $+6$ ‰ as observed in our study [30, 31]. Nitrogen depletions that we revealed between fish samples and flies are not common, but such findings were also made in scale bugs and aphids [30]. However, those scale bugs and aphids were reared on a plant diet (thai dragon pepper) and not on a meat-based diet, like fish, in our case.

The empty puparial cases of flies showed a depletion of $\Delta^{15}\text{N}$ compared to their respective diets. As the cases are mainly composed of chitin, this finding was comparable with observations described by DeNiro & Epstein [32] for the chitin exoskeleton of *Melanophus* (grasshopper) and *Oncopeltus* (milkweed bug), who also revealed ^{15}N -depletion of the chitin compared to the diets. Schoeninger (1995) offers a possible explanation for this observation by suggesting that the bonds in amino acids containing ^{14}N break faster during metabolism than in those containing ^{15}N . Excretory urea or ammonia is therefore ^{15}N -depleted [17, 34], and because the nitrogen of chitin is derived from excretory ammonia [34], it is, therefore, also ^{15}N -depleted.

Table 2 Mean (\pm SD) isotopic enrichments of nitrogen and carbon in adult flies and empty puparia in comparison to their diets (tissues)

	<i>n</i>	$\Delta^{15}\text{N}_{\text{Flies}}$	SD	$\Delta^{15}\text{N}_{\text{Puparia}}$	SD	$\Delta^{13}\text{C}_{\text{Flies}}$	SD	$\Delta^{13}\text{C}_{\text{Puparia}}$	SD
Boar	3	2.19	± 0.48	-2.89	± 0.54	-0.65	± 0.11	-0.73	± 0.08
Cat	3	4.23	± 0.51	-0.10	± 0.58	-0.54	± 0.05	-0.98	± 0.08
Cattle	3	4.51	± 0.56	-0.51	± 0.83	-0.01	± 0.13	-1.08	± 0.10
Chicken	3	3.57	± 0.41	-1.23	± 0.62	-0.60	± 0.36	-0.76	± 0.42
Dog	3	2.72	± 0.75	-2.91	± 1.05	-0.26	± 0.29	-0.88	± 0.25
Domestic pig	3	3.51	± 0.08	-1.55	± 0.32	-0.05	± 0.23	-0.71	± 0.21
Fish	3	-0.56	± 0.67	-3.92	± 0.26	0.69	± 0.16	-1.08	± 0.07
Human	10	2.65	± 0.83	-2.24	± 0.69	-0.40	± 0.50	-0.69	± 0.32
Rabbit	3	4.25	± 0.27	-1.58	± 0.28	0.36	± 0.05	-0.79	± 0.09
Roe deer	3	2.62	± 1.36	-2.36	± 1.31	-0.64	± 0.55	-0.90	± 0.24
Sheep	3	3.86	± 0.13	-1.04	± 0.01	-0.12	± 0.15	-0.55	± 0.09
Shrew	4	3.26	± 0.66	-1.93	± 1.50	0.22	± 0.36	-0.38	± 0.03
Squirrel	5	4.10	± 0.37	-1.50	± 0.63	0.08	± 0.37	-0.92	± 0.20

Although our study revealed distinct isotope signatures for humans and single animal species and in the empty puparial cases and adult flies that had developed on these tissues, our results so far only provide indication of the flies' nutritional history. They do not provide significant evidence, such as a forensic DNA sequence analysis would [35]. Especially the isotopic carbon and nitrogen signatures of humans, cats, and dogs were quite similar to each other and a simultaneous occurrence could make a differentiation impossible. Therefore, a third chemical element like sulfur and its isotopes ($\delta^{34}\text{S}$) is maybe worth to investigate in flies. Like carbon isotopes, sulfur isotopes are almost similar in consumers and their diets and are therefore suitable for examining the food history. However, as the $\delta^{34}\text{S}$ values in diets are dependent on the geographic location to the sea, they are also used for the analysis of provenance [36]. This fact could have an additional profit in case of a relocated body for example, if only flies are present at the abandoned crime scene and might indicate information on the identity of the disappeared body.

Humans and animals vary in their carbon and nitrogen isotope signatures as a function of their global distribution [20]. Their individual dietary habits [25], and also environmental influences, such as the "canopy effect" and/or the application of fertilizers, can influence $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values in plants and humans/animals [17, 37, 38]. In forensic casework, we, therefore, strongly recommend that the isotope signatures for the body in question should also be determined so that they can be compared with the signatures from the evidentiary entomological specimens from the crime scene.

Further parameters, which need to be investigated, should focus on changes in the isotope ratios of adult flies due to food intake during adulthood and a possible linked metabolic turnover. Such observations were made by Heinrich et al. (2012) on the basis of a diet change in adult *Musca domestica* and were also described for a broad range of species and their tissues [27,

39]. However, in such a case, it could be also worth to analyze the application of inert body parts, like wings for example, as a metabolic turnover will not be expected in this case. Moreover, investigations should also examine whether the isotope ratios in empty puparial cases remain constant despite weathering for a period of several months or years.

Acknowledgments We thank Dr. Christoph Schomerus (Dr. Senkenbergische Anatomy, University Hospital Frankfurt, Germany), Dr. Kernt Köhler (Institute of Veterinary Pathology, Gießen, Germany), and Dr. Christa Tandi (Central research facility, University hospital Frankfurt, Germany) for providing tissue donations/samples. We would also like to thank both anonymous reviewers who substantially improved the manuscript with their comments and corrections.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

References

- Sanford MR (2015) Forensic entomology of decomposing humans and their decomposing pets. *Forensic Sci Int* 247:e11–e17. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.11.029>
- Amendt J, Richards CS, Campobasso CP, Zehner R, Hall MJR (2011) Forensic entomology: applications and limitations. *Forensic Sci Med Pathol* 7(4):379–392. <https://doi.org/10.1007/s12024-010-9209-2>
- Catts EP (1992) Problems in estimating the postmortem interval. *J Agric Entomol* 9:245–255

4. Matuszewski S, Bajerlein D, Konwerski S, Szpila K (2008) An initial study of insect succession and carrion decomposition in various forest habitats of Central Europe. *Forensic Sci Int* 180(2-3):61–69. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2008.06.015>
5. Payne JA (1965) A summer carrion study of the baby pig *Sus scrofa* Linnaeus. *Ecology* 46(5):592–602. <https://doi.org/10.2307/1934999>
6. Amendt J, Campobasso CP, Gaudry E, Reiter C, LeBlanc HN, Hall MJ, European Association for Forensic Entomology (2007) Best practice in forensic entomology—standards and guidelines. *Int J Legal Med* 121(2):90–104. <https://doi.org/10.1007/s00414-006-0086-x>
7. Pechal JL, Moore H, Drijfhout F, Benbow ME (2014) Hydrocarbon profiles throughout adult Calliphoridae aging: a promising tool for forensic entomology. *Forensic Sci Int* 245:65–71. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.10.019>
8. Bernhardt V, Hannig L, Kinast R, Verhoff MA, Rothweiler F, Zehner R, Amendt J (2017) Quantitative pteridine fluorescence analysis: a possible age-grading technique for the adult stages of the blow fly *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae). *J Insect Physiol* 98:356–359. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2017.03.002>
9. Zhu GH, Ye GY, Li K et al (2013) Determining the age of adult flesh flies, *Boettcherisca peregrina*, using pteridine fluorescence. *Med Vet Entomol* 27(1):59–63. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2012.01021.x>
10. Zhu GH, Jia ZJ, XJ Y et al (2017) Predictable weathering of puparial hydrocarbons of necrophagous flies for determining the postmortem interval: a field experiment using *Chrysomya ruffifacies*. *Int J Legal Med* 131(3):885–894. <https://doi.org/10.1007/s00414-016-1507-0>
11. Zhu GH, XJ Y, Xie LX et al (2013) Time of death revealed by hydrocarbons of empty puparia of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae): a field experiment. *PLoS One* 8(9):e73043. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073043>
12. Zhu GH, XH X, XJ Y et al (2007) Puparial case hydrocarbons of *Chrysomya megacephala* as an indicator of the postmortem interval. *Forensic Sci Int* 169(1):1–5. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.06.078>
13. Bernhardt V, Pogoda W, Verhoff MA, Toennes SW, Amendt J (2017) Estimating the age of the adult stages of the blow flies *Lucilia sericata* and *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) by means of the cuticular hydrocarbon n-pentacosane. *Sci Justice* 57(5):361–365. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2017.04.007>
14. Archer MS, Elgar MA, Briggs CA, Ranson DL (2006) Fly pupae and puparia as potential contaminants of forensic entomology samples from sites of body discovery. *Int J Legal Med* 120(6):364–368. <https://doi.org/10.1007/s00414-005-0046-x>
15. Marchetti D, Arena E, Boschi I, Vanin S (2013) Human DNA extraction from empty puparia. *Forensic Sci Int* 229(1-3):e26–e29. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.03.043>
16. Schoeninger MJ, DeNiro MJ (1984) Nitrogen and carbon isotopic composition of bone collagen from marine and terrestrial animals. *Geochim Cosmochim Acta* 48(4):625–639. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(84\)90091-7](https://doi.org/10.1016/0016-7037(84)90091-7)
17. Schoeninger MJ (1995) Stable isotope studies in human evolution. *Evol Anthropol Issues News Rev* 4:83–98
18. O'Leary MH (1981) Carbon isotope fractionation in plants. *Phytochemistry* 20(4):553–567. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(81\)85134-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(81)85134-5)
19. Eggers T, Jones TH (2000) You are what you eat...or are you? *Trends Ecol Evol* 15(7):265–266. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(00\)01877-2](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(00)01877-2)
20. Huelsemann F, Lehn C, Schneider S et al (2015) Global spatial distributions of nitrogen and carbon stable isotope ratios of modern human hair. *Rapid Commun Mass Spectrom* 29(22):2111–2121. <https://doi.org/10.1002/rcm.7370>
21. Bol R, Pflieger C (2002) Stable isotope (^{13}C , ^{15}N and ^{34}S) analysis of the hair of modern humans and their domestic animals. *Rapid Commun Mass Spectrom* 16(23):2195–2200. <https://doi.org/10.1002/rcm.706>
22. Schoeninger MJ (2014) Stable isotope analyses and the evolution of human diets. *Annu Rev Anthropol* 43(1):413–430. <https://doi.org/10.1146/annurev-anthro-102313-025935>
23. Boecklen WJ, Yarnes CT, Cook BA, James AC (2011) On the use of stable isotopes in trophic ecology. *Annu Rev Ecol Syst* 42(1):411–440. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-102209-144726>
24. Meier-Augenstein W (2010) Stable isotope forensics—an introduction to the forensic application of stable isotope analysis/Wolfram Meier-Augenstein. Wiley Blackwell
25. Petzke KJ, Boeing H, Metzges CC (2005) Choice of dietary protein of vegetarians and omnivores is reflected in their hair protein ^{13}C and ^{15}N abundance. *Rapid Commun Mass Spectrom* 19(11):1392–1400. <https://doi.org/10.1002/rcm.1925>
26. Fraser RA, Bogaard A, Schäfer M, Arbogast R, Heaton THE (2013) Integrating botanical, faunal and human stable carbon and nitrogen isotope values to reconstruct land use and palaeodiet at LBK Vaihingen an der Enz, Baden-Württemberg. *World Archaeol* 45(3):492–517. <https://doi.org/10.1080/00438243.2013.820649>
27. Tieszen LL, Boutton TW, Tesdahl KG, Slade NA (1983) Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: implications for $\delta^{13}\text{C}$ analysis of diet. *Oecologia* 57(1-2):32–37. <https://doi.org/10.1007/BF00379558>
28. Markow TA, Anwar S, Pfeiler E (2000) Stable isotope ratios of carbon and nitrogen in natural populations of *Drosophila* species and their hosts. *Funct Ecol* 14(2):261–266. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.2000.00408.x>
29. Heinrich K, Weaver RJ, Bell HA (2012) Determining the source of house flies (*Musca domestica*) using stable isotope analysis. *Pest Manag Sci* 68(1):31–37. <https://doi.org/10.1002/ps.2215>
30. McCutchan JH, Lewis WM, Kendall C, McGrath CC (2003) Variation in trophic shift for stable isotope ratios of carbon, nitrogen, and sulfur. *Oikos* 102(2):378–390. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2003.12098.x>
31. Peterson BJ, Fry B (1987) Stable isotopes in ecosystem studies. *Annu Rev Ecol Syst* 18(1):293–320. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.18.110187.001453>
32. DeNiro MJ, Epstein S (1981) Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochim Cosmochim Acta* 45(3):341–351. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(81\)90244-1](https://doi.org/10.1016/0016-7037(81)90244-1)
33. Minagawa M, Wada E (1984) Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: further evidence and the relation between $\delta^{15}\text{N}$ and animal age. *Geochim Cosmochim Acta* 48(5):1135–1140. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(84\)90204-7](https://doi.org/10.1016/0016-7037(84)90204-7)
34. Webb SC, Hedges RE, Simpson SJ (1998) Diet quality influences the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of locusts and their biochemical components. *J Exp Biol* 201(Pt 20):2903–2911
35. Jobling MA, Gill P (2004) Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nat Rev Genet* 5(10):739–751. <https://doi.org/10.1038/nrg1455>
36. Lehn C, Graw M (2014) Stabilisotopenanalysen an Körpergeweben von unbekanntem Personen: Grundlagen, Probenahme, Analysen, Interpretation. *Rechtsmedizin* 24(2):129–143. <https://doi.org/10.1007/s00194-014-0946-5>
37. Ben-David M, Flaherty EA (2012) Stable isotopes in mammalian research: a beginner's guide. *J Mammal* 93(2):312–328. <https://doi.org/10.1644/11-MAMM-S-166.1>
38. Rubenstein DR, Hobson KA (2004) From birds to butterflies: animal movement patterns and stable isotopes. *Trends Ecol Evol* 19(5):256–263. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.03.017>
39. Fry B (2006) Stable isotope ecology. Springer, New York. <https://doi.org/10.1007/0-387-33745-8>

Erklärung zu den Autorenanteilen an der Publikation:**Species diversity and tissue specific dispersal of necrophagous Diptera on human bodies**Status (*submitted, under review, in revision, accepted*): *accepted*Ab *accepted* Name der Zeitschrift: Forensic Science, Medicine and Pathology

Beteiligte AutorInnen (Namen mit eindeutigen Kürzeln):

Bernhardt, Victoria (VB)

Miklós Bálint (MB)

Verhoff, Marcel A. (MAV)

Amendt, Jens (JA)

Was hat der Promovierende bzw. was haben die Koautoren beigetragen?**(1) zu Entwicklung und Planung**

VB: 70 %

JA: 30 %

(2) zur Durchführung der einzelnen Untersuchungen und Experimente

VB: 100 %

(3) zur Erstellung der Datensammlung und Abbildungen

VB: 80 %

MB: 20 %

(4) zur Analyse und Interpretation der Daten

VB: 50 %

MB: 30 %

JA: 20 %

(5) zum Verfassen des Manuskripts

VB: 80 %

MB: 5 %

JA: 10 %

MAV: 5 %



Species diversity and tissue specific dispersal of necrophagous Diptera on human bodies

Victoria Bernhardt^{1,2} · Miklós Bálint³ · Marcel A. Verhoff¹ · Jens Amendt¹

Accepted: 3 January 2018

© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract

In forensic entomology, many studies analyze fly activity and succession on dead bodies by using pig cadavers and a variety of small baited traps. Data on real human bodies are very rare. To address this shortcoming, we analyzed the fly fauna of 51 human bodies in Germany. Sex, age, place of discovery, and presumed time of death were noted. Larvae were sampled during autopsy according to body region or tissue. For every infested region, the total number of fly larvae were estimated and classified into categories of 1–10, 11–50, and 50+. All samples were identified to the species level. Besides a descriptive analysis of their occurrence patterns, a categorical PCA was performed, and multispecies generalized linear models and a latent variable model were run. Our results highlight the most forensically important blow flies on human bodies in Central Europe (*Lucilia sericata*, *L. ampullacea*, *Phormia regina*, *Calliphora vicina*); prove, for the first time, the general transferability of species lists based on succession studies on pig cadavers; recommend a certain set of species, such as the so-far neglected *L. ampullacea*, for future developmental studies; and reveal competitive occurrence of up to six species on the same body as a potential factor of influence. Assignment to a certain body region was often possible and our data clearly indicate certain tissues, e.g. brain, as of high interest for future developmental studies. Focusing on real scenario settings helps direct research to forensically relevant questions and appraises the plausibility of vital laboratory studies.

Keywords Forensic entomology · Flies · Diversity · Distribution · Human cadaver · Body region

Introduction

The estimation of the minimal post-mortem interval (PMI_{min}) based on insect succession and the development rates of necrophagous fly species, is one of the main tasks of forensic entomology [1–4]. Within minutes after death, the first insects on the body, often blow flies (Calliphoridae), are potentially able to oviposit into the body's natural orifices [1, 3]. While the development rates of the resulting larvae and pupae are

determined mainly by species and ambient temperature [5], the presence or absence of single species on the body is influenced by their annual phenology, microclimatic conditions of the crime scene, and the temperature thresholds to their activity, as well as random factors (e.g. an open window). Annual phenology describes the seasonal activity peaks and fluctuations of insects during the year, while the thresholds describe either the temperatures required for a species to complete its developmental cycle or those that govern the daily activity of the adult stage [6]. Hence, different species are found on bodies depending on the time of year and the meteorological conditions at the time of death [7]. Knowing the activity and oviposition patterns of necrophagous Diptera can help entomologists estimate the time of colonization of a body. Several studies have, therefore, analyzed the ecology of these specialized insects by placing baited traps in the field [8–10] or by evaluating the insect succession on carrion. Pig cadavers are most frequently used as a standard surrogate, to simulate human bodies, in field studies of this kind [11, 12]. Accordingly, entomological data for actual human bodies are, therefore, quite rare [13–15].

✉ Victoria Bernhardt
 bernhardt@med.uni-frankfurt.de

¹ Institute of Legal Medicine, University Hospital Frankfurt am Main, Goethe-University, Kennedyallee 104, D-60596 Frankfurt am Main, Germany

² Department of Aquatic Ecotoxicology, FB Biowissenschaften, Goethe-University, Max-von-Laue-Str. 13, D-60438 Frankfurt am Main, Germany

³ Senckenberg Biodiversity and Climate Research Centre, Senckenberganlage 25, D-60325 Frankfurt am Main, Germany

To gain understanding of the subsequent developmental variation of juvenile fly stages, laboratory-based studies using animal tissues have been conducted (e.g. [16, 17]). This practice is, however, being questioned, as the decomposition and insect fauna of pigs and humans could differ significantly. Moreover, the growth rate of larvae may differ for different types of nutrition tissue. It is, therefore, common practice to analyze factors like type of food tissue [18–20], drugs in this tissue [21–23], or intra- and interspecific competition [24–27] as possible factors for developmental plasticity. Due to the fact that several studies, e.g. [18–20, 26, 28, 29], found significant differences in larval growth and development times of different blow fly species on tissues, like lung, brain, liver, muscle, and heart, interest is beginning to focus on nutritional tissue type as a possible factor influencing larval development in flies. In consequence, some authors recommend recording the type of tissue, or the body region, from which larvae are collected from a body during examination [18–20, 26]. However, because of a possible larval mass effect [30] or intra- or interspecific competition [24–27], not only the tissue type should be considered as a factor of influence, but also the number of larvae found.

Against this backdrop, the aim of the present study was to analyze the diversity and abundance of fly fauna found on human bodies and to evaluate the tissue-specific abundance and distribution patterns of the fly larvae on these.

Material & methods

From May 2014 to August 2016, fly larvae from 51 bodies, which died in the area of Frankfurt/Germany, were sampled during autopsy. Sex, age, date of autopsy, the place of finding (indoors or outdoors), and the post mortem interval (when known) were noted for each body based on the time last seen or other hints, such as letters, newspapers or phone calls.

Fly larvae were sampled and sorted according to the body region where they were found. Altogether 15 different body regions, or tissues, were sampled: eyes, brain, face, oral cavity, trachea, lung, liver, heart, muscle, abdominal cavity (tissue could not be further specified), torso (outside), arms, legs, anogenital region, and urinary bladder.

“Outdoors” did not necessarily mean “in the field,” but rather described the accessibility of a body to insects. One body, for example, was found on a balcony and was therefore classified as an “outdoor” finding.

For every infested body region, or tissue type, of a body, the total number of larvae were estimated and classified into categories of 1–10, 11–50, or 50+ larvae. In cases with a small number of larvae (up to 50), all of the larvae were sampled; in cases with a large number of larvae, or a larval mass, 3–4 teaspoonful of larvae from a region were sampled representatively.

After collection of the larvae, specimens from the sampled region were killed by means of almost boiling water and afterwards transferred into a falcon tube containing 96% ethanol. The identification of blow fly larvae was performed on the basis of morphological characteristics [31]. The identification of all other fly taxa was determined by sequencing the mitochondrial *cytochrome c oxidase subunit I (coxI)* gene. The universal PCR primers LCO1490 and HCO2198 [32] were used to amplify the commonly used 648-bp long *coxI* barcoding region.

Statistics

All data were analyzed and charted by means of R, version 3.4.1, (Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) and IBM SPSS Statistics, version 22, (IBM, Ehningen, Germany). Descriptive analysis and categorical PCA (catPCA) was performed with SPSS.

The effects of body region, month of sampling, and indoor/outdoor location were evaluated by running multispecies generalized linear models (GLM) with the “mvabund” R package [33]. Because the observations of fly larvae were categorized into abundance classes, they were modeled as ordinal data via cumulative link models with the “ordinal” R package. Forward selection was used to test increasingly complicated models. ANOVA was then used to evaluate the contribution of every newly added variable to the general variation, explained in larval abundance differences. Only relatively common species (i.e. observed at least five times during the entire study) were considered in the GLMs since very rare species do not contain sufficient information to evaluate predictors of community composition. A latent variable model (LVM), as implemented in the “boral” R package [34], was used to infer possible interactions from the residual covariance matrix of fly larvae. All recorded environmental variables were included as covariates of abundances (body region, month, indoor/outdoor scenario, sex of the body).

Results

Background information on bodies

Of the 51 bodies, 66.6% ($n = 34$) were male and 33.3% ($n = 17$) female. The largest age class (48%) was between 51 to 70 years old, while the second largest (30%) was between 31 to 50 years. The vast majority of the bodies, 82.4% ($n = 42$), were located indoors, inside apartments, while only 17.6% ($n = 9$) were outdoors. The earliest fly-infested bodies were discovered in April and the latest in November. Based on police investigations, the post mortem interval ranged between 1 and about 40 days.

Fly species

Fifteen fly species were found (Table 1). The largest group was represented by blowflies (Diptera: Calliphoridae) (53.3%; $n = 8$ blow fly species) and included *Lucilia sericata* (MEIGEN, 1826), *L. ampullacea* (VILLENEUVE, 1922), *L. caesar/illustris* (a more exact identification of *L. caesar/L. illustris* was in some cases not possible due to weak larval characters and a still not clarified molecular ID), *Calliphora vicina* (ROBINEAU-DESVOIDY, 1830), *C. vomitoria* (LINNAEUS, 1758), *Phormia regina* (MEIGEN, 1826), *Protophormia terraenovae* (ROBINEAU-DESVOIDY, 1830), and *Chrysomya albiceps* (WIEDEMANN, 1819). The second largest group was represented by houseflies (Diptera: Muscidae) (33.3%; $n = 5$ house fly species), including *Musca domestica* (LINNAEUS, 1759), *Muscina stabulans* (FALLEN, 1817), *Hydrotaea aenescens* (WIEDEMANN, 1830), *H. ignava* (HARRIS, 1780), and *H. dentipes* (FABRICIUS, 1805). Flesh flies (Diptera: Sarcophagidae) and scuttle flies (Diptera: Phoridae) were represented by only one species each, namely *Sarcophaga agyrostoma* (ROBINEAU-DESVOIDY, 1830) and *Megaselia scalaris* (LOEW, 1866).

The most abundant taxon was *L. sericata*, followed by *L. ampullacea*, *P. regina* and *C. vicina* respectively (Table 1). Most of the fly species (Calliphoridae & Sarcophagidae) occurred both on bodies that were discovered indoors and those that were discovered outdoors, but all Muscidae and the scuttle fly *M. scalaris* were solely discovered on bodies found inside apartments (Fig. 1). The blow fly *C. vicina* was significantly ($p < 0.05$) more abundant indoors, while *L. caesar/illustris*, as well as *L. ampullacea*, were

Table 1 List of fly species found on 51 bodies ($n =$ number of bodies) during a 28-month surveillance period, sorted according to taxonomy and abundance of the single species

Family	Species	n	%
Calliphoridae	<i>L. sericata</i>	44	86.3
	<i>L. ampullacea</i>	23	45.1
	<i>P. regina</i>	22	43.1
	<i>C. vicina</i>	22	43.1
	<i>P. terraenovae</i>	16	31.4
	<i>C. vomitoria</i>	12	23.5
	<i>L. caesar/illustris</i>	10	19.6
	<i>Ch. albiceps</i>	5	9.8
Muscidae	<i>M. domestica</i>	2	3.9
	<i>M. stabulans</i>	1	2.0
	<i>H. dentipes</i>	1	2.0
	<i>H. aenescens</i>	1	2.0
	<i>H. ignava</i>	1	2.0
Phoridae	<i>M. scalaris</i>	3	5.9
Sarcophagidae	<i>S. agyrostoma</i>	7	13.7

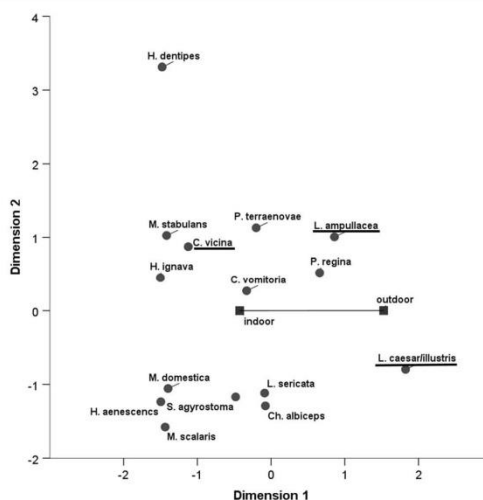


Fig. 1 Biplot of the location of finding (indoor & outdoor: squares) and fly species (solid circles). Underlines represent significant effects between fly species and location ($p < 0.05$): all Muscidae and the scuttle fly *M. scalaris* were discovered only on bodies found inside apartments

predominantly found outdoors ($p < 0.05$). With reference to the bodies found indoors, 24.4% were infested with only one fly species, while the majority (29.3%) was infested with four different species. In three indoor cases, six different species occurred on the body. Bodies that were discovered outdoors did not exhibit mono-colonization at all and were infested by at least two different species.

The multispecies GLMs showed that the month of observation and the indoor/outdoor scenarios both statistically significantly improved the ability of models to predict fly larvae observations (month: sum of likelihood ratios $LR = 68.913$, $p < 0.02$; indoor/outdoor: $LR = 95.17$, $p < 0.02$). Although the effects of month and scenario are partially correlated (Fig. 3), the model with both month and scenario as predictors statistically significantly explained more information in larva abundances than models with only one of these predictors. In contrast, body region does not seem to be a statistically significant predictor of larva abundances ($LR = 145.81$, $p = 0.88$).

In our sampling period, the first body infested by fly larvae was found in April and the last in November. Peak colonization (highest number of fly-infested bodies) was reached in July and August (Table 2). *Ch. Albiceps* only occurred on bodies in August, while *C. vomitoria* and *C. vicina* were, with one exception, almost absent in August. These occurrence patterns were significant ($p < 0.05$) for *Ch. albiceps* and *C. vicina*. Biplots of catPCA (Fig. 2) also indicated that *M. scalaris*, *C. vicina*, and *C. vomitoria* tended to occur on bodies during moderate temperatures in spring and fall, rather

Table 2 Fly species found on 51 bodies during a 28-month surveillance period, according to the month of discovery. Numbers indicate the number of bodies which were found in a given month

Family	Species	Month								
		April	May	June	July	August	September	October	November	
Calliphoridae	<i>L. sericata</i>	1	5	5	16	12	3	1	1	
	<i>L. ampullacea</i>		3	2	12	4	1	1		
	<i>P. regina</i>			3	11	6	1	1		
	<i>C. vicina</i>	3	6	5	4	1	2	1		
	<i>P. terraenovae</i>		1	3	7	4	1			
	<i>C. vomitoria</i>		3	2	3		1	2	1	
	<i>L. caesar/illustris</i>			2	4	3		1		
	<i>Ch. albiceps</i>					5				
Muscidae	<i>M. domestica</i>			1	1					
	<i>M. stabulans</i>					1				
	<i>H. dentipes</i>					1				
	<i>H. aenescens</i>				1					
	<i>H. ignava</i>					1				
Phoridae	<i>M. scalaris</i>	1					1	1		
Sarcophagidae	<i>S. argyrostoma</i>		1	1	2	2	1			

than during summer, whereas the majority of other fly species tended to be present (solely) during the warmer summer season. A summary that presents fly species occurrence as a function of month and location of body shows (Fig. 3) not only that there is a relation between fly species occurrence and month, but also that the outdoor scenarios were more

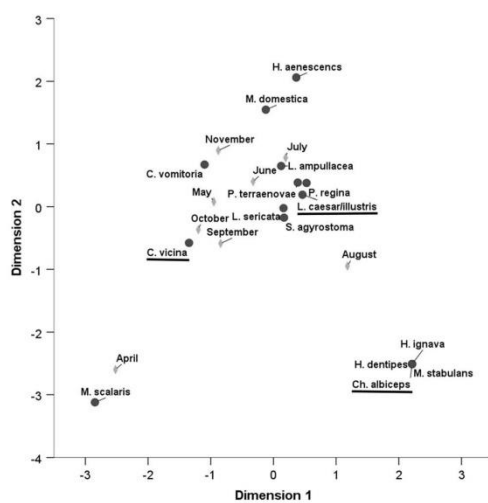


Fig. 2 Biplot of month of discovery of the body (rhombuses) and fly species (solid circles). Underlines represent a significant effect between fly species and the month of discovery ($p < 0.05$): *M. scalaris*, *C. vicina*, and *C. vomitoria* tended to occur in spring and fall, whereas *Ch. albiceps*, for example, occurred exclusively in August

frequent with increasing temperatures in summer. The residual covariance matrix of the fly larvae indicated that differences in the abundances of most, but not all, species were caused by different environmental preferences (month, indoor/outdoor, body region, sex), rather than by biotic interactions. Biotic interactions, rather than niche-filtering effects, might also have caused abundance differences in the species pairs *M. scalaris* and *P. terraenovae*, and *Ch. albiceps* and *C. vomitoria*: these species are unlikely to occur together on the same body/body region if all recorded environmental effects are excluded (Fig. 4).

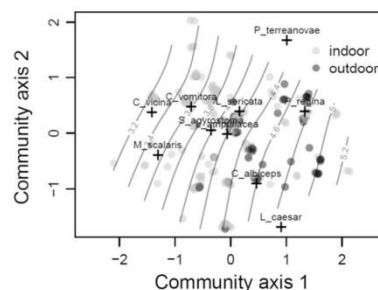


Fig. 3 Ordination plot of samples (body regions) according to the fly communities (crosses). Symbols are colored according to the place of finding (light grey: indoor; dark grey: outdoor). Months are overlaid as a continuous variable (grey lines). There is a succession in the composition of fly larvae communities from April to November, although the highest abundances of larvae were usually observed in July. This effect is only partially collinear with the indoor-outdoor scenarios, although outdoor scenarios became more frequent during the later months

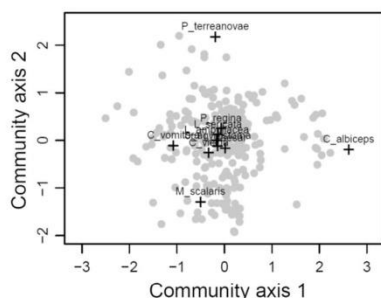


Fig. 4 Residual covariance matrix of the fly species. Grey symbols represent the body regions of the 51 bodies, arranged according to the observed larval community compositions. The patterns in species co-occurrence are independent of the recorded environmental covariates (e.g., body region, month, etc.), which are controlled independently by the latent variable model. The LVM suggests that the reciprocal exclusion of species pairs *P. terraenovae* and *M. scalaris*, and *C. vomitoria* and *Ch. albiceps*, may result from biotic interactions rather than distinct environmental preferences. All other species group together around the origin on the ordination: this means that the recorded environmental variables are sufficient to explain most variation in their co-occurrences

Infested body regions and species distribution

The infestation pattern of the 51 human bodies was very specific for each body with regard to infested body regions and occurring fly species.

Altogether, 15 body regions, or tissue types, were infested with fly larvae: eyes, brain, face, oral cavity, trachea, lung, liver, heart, muscle, abdominal cavity, torso, arms, legs, anogenital region, and urinary bladder (Table 3). Some tissues or organs, like the esophagus, stomach, gut, and kidney, were never infested. The most infested body regions, with more than 20% infestation, were the eyes, brain, face, oral cavity, trachea, lung, torso, arms, legs, and the anogenital region. Inner organs like the liver and heart were rarely infested (Table 3).

Frequent infestation of a certain body region did not automatically result in a large quantity of larvae (Fig. 5). While the lung, for example, was infested in 45.1% of cases, the quantity of larvae was rather low (1–10 larvae). In contrast, the quantity of larvae on the face and torso, and in the oral cavity and the anogenital region, was in general very high, with more than 50 larvae.

The species distribution on different body regions did not indicate a significant species-specific preference for a certain body region.

Discussion

To summarize the history of the 51 human bodies analyzed in the present study, the typical body infested by insects was

Table 3 Fly infested body regions of 51 bodies (n) during a 28-month surveillance period

Body regions	n	%
Face	39	76.5
Torso (outside)	35	68.6
Oral cavity	33	64.7
Anogenital region	29	56.9
Brain	28	54.9
Trachea	28	54.9
Eyes	23	45.1
Lung	23	45.1
Arms	20	39.2
Legs	20	39.2
Abdominal cavity	8	15.7
Muscle	5	9.8
Heart	2	3.9
Liver	2	3.9
Urinarybladder	1	2.0

male, between 51 and 70 years old, and located indoors. Unsurprisingly, the number of infested bodies increased with higher temperatures towards summer and decreased with lower temperatures towards winter. No insect-infested bodies came for autopsy between December and the beginning of April; this was, however, only the case for the present study period, and is not generally the rule. Like Sanford [35], we also detected a significant dependence of species occurrence on seasonality and location (indoor/outdoor), irrespective of

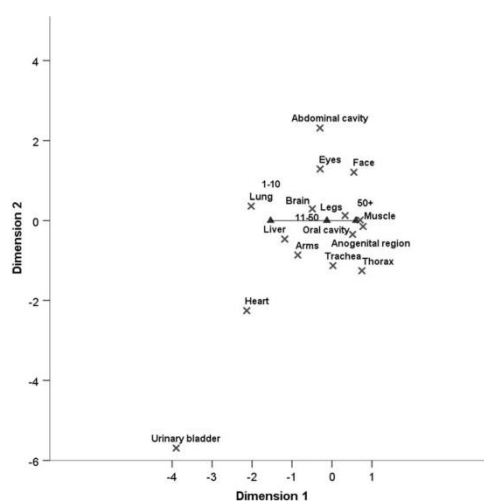


Fig. 5 Biplot of body regions (crosses) and the classified number of larvae per body region (triangles). Heart and urinary bladder were rarely infested, and if, then only by a small number of larvae

the fact that, for geographical reasons, our local species composition and climatic factors differed from those in Sanford's study. However, the observation that *C. vicina* prefers indoor scenes and *L. caesar/illustris* outdoor scenarios can be supported by the study of Reibe & Madea [36] who investigated in the area of Cologne/Germany the colonization of pig carcasses and compared indoor and outdoor locations.

In the past, several studies [18–20, 26, 28, 29] investigated larval growth and development of juvenile necrophagous Diptera on different food substrates, respectively, on different tissue types. The results of these studies revealed tissue-specific rates of development. The authors of these studies, therefore, recommend documenting which part of a body larvae are sampled from so that the calculation of the development time can optionally be adapted for the respective nutritional tissue type [18–20, 26].

Our study highlights some of the problems encountered in the approach recommended above. While assignment to a body site may theoretically be feasible for larvae sampled during autopsy, it must be borne in mind that these specimens, which were classified to a specific body site or tissue, might have been displaced from their initial feeding site; for example, by handling and transport of the body. It must also be noted that larvae are highly mobile, making it very difficult, or even impossible, to know their nutrition history by focusing on their current feeding spot. Eyes or the tongue, for example, do not offer a reasonable amount of food for a group of growing maggots, and it also seems likely that specimens found on brain may have mixed dietary experiences, perhaps having moved from the oral cavity and eyes into deeper areas of the skull. While in some cases, or for some body regions, the assignment of larvae to a specific body site is not that difficult due to anatomical characteristics (Fig. 6), it can, in other cases, be impossible to define an organ or type of tissue with certainty, depending on the condition, or degree of decomposition, of the body (Figs. 7 and 8). Some organs, like liver, heart, or kidney, which were investigated as a diet for blow flies by Clark et al. [18], Kaneshraja & Turner [19], and El-Moaty & Kheirallah [28], were never, or only rarely, colonized in our study. Even the lung, which was infested in 23 of 51 cases, could be disregarded as a major diet, since the majority of infestations of this organ showed only a few larvae (1–10). These results imply that studies investigating the diet-specific growth of fly larvae should first identify relevant organs and tissues types and then more selectively choose the food source for the experiments. In general it could be observed that sites which are preferred for oviposition, like the natural orifices, mouth, eyes or anogenital region for example [37], were also, together with adjacent sites, preferred for development. Our data, for example, clearly indicate that brain is a tissue of high interest for studies of this kind.

All of the Diptera detected in the present study are also more or less frequently found in insect succession studies on

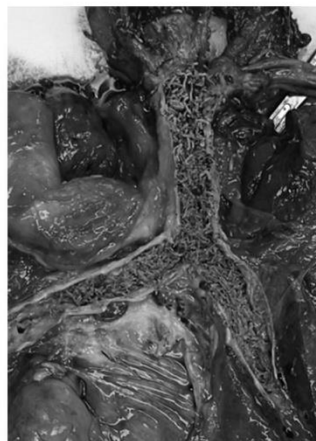


Fig. 6 Open trachea of a body with fly larvae, during autopsy. Due to the anatomy of this tissue, an assignment of larvae to tissue type was easy to perform

pig cadavers [12]. Hence, our data clearly confirm that the fly fauna of decomposing pigs is very comparable with that of decomposing human bodies. As noted in the pig experiments, blow flies were also the most abundant and important key elements of the cadaver fauna in the present study. *L. sericata* was most common and frequently abundant from early spring to fall, followed by *L. ampullacea*. The importance of *L. ampullacea* is supported by Fremdt & Amendt [8], who described adult *L. ampullacea* as the third most abundant blow fly species caught in their Catope-watertraps in the area of Frankfurt/Germany. Moreover, several succession experiments have also proved that this species is frequent [11, 12, 38–40]. Nonetheless, so far no studies have paid attention to this species' development. These findings clearly show another benefit of our evaluation of "real cases," i.e. human bodies, as such data help focus research on certain taxa of special interest in forensic entomology. The latent variable model



Fig. 7 Decomposed thoracic and abdominal cavity with fly larvae. An assignment of larvae to a tissue was not feasible



Fig. 8 Thoracic and abdominal cavity of a female body with pupae and empty puparia inside the oral cavity. The inner organs were no longer definable

(LVM) we applied in this study predicts species interactions and co-occurrences that are unlikely to be caused by the environmental factors tested in this study and, thus, focuses on real biological associations. In this context, it is striking that *L. ampullacea* never occurred on a body in the absence of *L. sericata*. It might, therefore, be promising to investigate the development of *L. ampullacea* not only in monoculture, but also together with *L. sericata* in an interspecific competition experiment. Quite generally, competition, and its impact on the biology of involved specimens, deserves more attention. Since 80.4% of the bodies in our study were infested by more than one species at the same time, interspecific competition should perhaps be more closely investigated. Possibly, the development and survival of Diptera may be significantly altered under such conditions [41, 42]. Interspecific competition is of special importance when facultative predatory taxa like *Ch. albiceps* or *Muscina* sp. are present [43, 44]. Grassberger et al. [44] showed in a breeding experiment with *L. sericata* and *Ch. albiceps* that, depending on the ratio of specimens, immature *L. sericata* showed mortality rates of up to 99%. Own data (unpublished) on the joint development of *C. vicina* and *Muscina prolapsa* revealed that the first pupation of *C. vicina* happened up to 27 h earlier under competition, compared to a control group without *M. prolapsa*. The first fly eclosion was even up to 48 h earlier when they were reared in competition, compared to a control group without *M. prolapsa*.

Although Grassberger et al. [44], as well as Grassberger & Frank [45], and Matuszewski et al. [46] reported about *Ch. albiceps* as a new forensic indicator in Central Europe, and despite the presence of *Ch. albiceps* in Germany since at least the year 2001, its occurrence on bodies in Germany has still been rather rare so far. In 2015 & 2016, *Ch. albiceps* actually occurred on a total of five bodies, and only in August, when temperatures, on average, reached at least 18.7 °C. This finding is in accordance with *Ch. albiceps*' lower development threshold, as reported by de Carvalho Queiroz [47], of at least

15.0 °C for the larval stages, respectively, 17.4 °C for the pupal stage, and 15.4 °C for the development from egg to adult fly. Fremd & Amendt [8] did not trap any *Ch. albiceps* between September 2008 and April 2011. However, zero records such as these do not necessarily mirror the absence of a species, but maybe instead simply the inefficiency of the used trapping system or bait. This possibility may also be illustrated by a further discrepancy between the present study and the one by Fremd & Amendt [8]. The latter researchers trapped 13 sarcophagid species, some even in high numbers, including *Sarcophaga albiceps*, *S. carnaris*, *S. subvicina*, and *S. variegata*, and, therefore, ascribe forensic relevance to all these species. In the present study, in contrast, the only flesh fly sampled from the bodies was *S. argyrostoma*, which although it was only very rarely found in the surveillance project conducted by Fremd & Amendt [8], has regularly been found during succession experiments on larger carrion and, in case work, on human bodies [9, 48]. Furthermore, the blow fly *P. regina*, which was, together with *C. vicina*, the third most abundant species on the bodies in our study, was almost absent in Fremd & Amendt's [8] traps. Thus, although setting up traps baited with, for example, 10 g beef liver and 500 µl dimethyl trisulfide, in seven day intervals [8], obviously attracts necrophagous flies, the findings still do not necessarily reflect reality and the insect fauna on a real cadaver. Not only do carrion, or, respectively, bodies, offer a variety of different tissue types to the necrophagous fauna, they also produce a large number of different volatile organic compounds during the ongoing decomposition process [49]. Additionally, there is permanent interaction between feeding insects and the decomposition processes, which might also lead to a unique odor profile. The resulting complex profile may lead to different levels of attraction for different taxa, leading to a discrepancy between surveillance studies and the real occurrence patterns on carrion.

Conclusion

A variable ecosystem, such as a cadaver, is not easy to analyze from an entomological point of view, as many decomposition and entomological processes are governed by climatic and interacting processes. Our study clearly illustrates the need for far more research work involving real scenario settings. Doing so will make it much easier to focus research on forensically relevant questions and to avoid purely academic questions and study designs; for example, such that involve less relevant insect species or unimportant diets. Moreover, with the help of realistic studies, completely new questions may become relevant and worthy of investigation.

In our study, we show new avenues for research in regard to rearing tissues that match larval growth rates in real-life settings. We highlight the most important taxa found on human

bodies in Central Europe and identify a number of insect species which are of forensic relevance during different seasons of the year. Additionally, we help focus future research on a certain set of forensically promising species; and last, but not least, reveal the potential impact of so-far neglected circumstances, such as the competitive occurrence of two or more species on one and the same corpse.

Key points

1. Location of bodies (indoor/outdoor) and month of observation improved models to predict fly larvae observations significantly.
2. Body region or tissue type revealed no significant effect on species distribution.
3. Up to six different species could be detected at a single body. Interspecific competition should be investigated in more detail in future research.
4. Fly species which were found on bodies were in accordance with fly species found in insect succession studies on pig cadavers for Central Europe.

Acknowledgements We thank Francis Hui for help with the “boral” package.

Funding This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and the 1964 Helsinki declaration and its later amendments, or comparable ethical standards. All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

References

1. Amendt J, Richards CS, Campobasso CP, Zehner R, Hall MJR. Forensic entomology: applications and limitations. *Forensic Sci Med Pathol.* 2011;7:379–92.
2. Catts EP, Goff ML. Forensic entomology in criminal investigations. *Annu Rev Entomol.* 1992;37:253–72.
3. Amendt J, Krettek R, Zehner R. Forensic entomology. *Naturwissenschaften.* 2004;91:51–65.
4. Greenberg B. Flies as forensic indicators. *J Med Entomol Entomological Society of America.* 1991;28:13.
5. Catts EP. Problems in estimating the postmortem interval. *J Agric Entomol.* 1992;9:245–55.
6. Amendt J, Campobasso CP, Gaudry E, Reiter C, LeBlanc HN, Hall MJR. Best practice in forensic entomology—standards and guidelines. *Int J Legal Med.* 2007;121:90–104.
7. Schroeder H, Klotzbach H, Püschel K. Insects' colonization of human corpses in warm and cold season. *Legal Med.* 2003;5: S372–4.
8. Fremdt H, Amendt J. Species composition of forensically important blow flies (Diptera: Calliphoridae) and flesh flies (Diptera: Sarcophagidae) through space and time. *Forensic Sci Int.* 2014;236:1–9.
9. Szpila K, Mađra A, Jarmusz M, Matuszewski S. Flesh flies (Diptera: Sarcophagidae) colonising large carcasses in Central Europe. *Parasitol Res.* 2015;114:2341–8.
10. Brundage A, Bros S, Honda JY. Seasonal and habitat abundance and distribution of some forensically important blow flies (Diptera: Calliphoridae) in Central California. *Forensic Sci Int.* 2011;212: 115–20.
11. Matuszewski S, Bajerlein D, Konwerski S, Szpila K. An initial study of insect succession and carrion decomposition in various forest habitats of Central Europe. *Forensic Sci Int.* 2008;180:61–9.
12. Matuszewski S, Szafalowicz M, Jarmusz M. Insects colonising carcasses in open and forest habitats of Central Europe: search for indicators of corpse relocation. *Forensic Sci Int.* 2013;231:234–9.
13. Schoenly KG, Haskell NH, Hall RD, Gbur JR. Comparative performance and complementarity of four sampling methods and arthropod preference tests from human and porcine remains at the Forensic Anthropology Center in Knoxville, Tennessee. *J Med Entomol.* 2007;44:881–94.
14. Shahid SA, Schoenly KG, Haskell NH, Hall RD, Zhang W. Carcass enrichment does not alter decay rates or arthropod community structure: a test of the arthropod saturation hypothesis at the anthropology research facility in Knoxville, Tennessee. *J Med Entomol.* 2003;40:559–69.
15. Schoenly KG, Shahid SA, Haskell NH, Hall RD. Does carcass enrichment alter community structure of predaceous and parasitic arthropods? A second test of the arthropod saturation hypothesis at the Anthropology Research Facility in Knoxville, Tennessee. *J Forensic Sci.* 2005;50:134–42.
16. Grassberger M, Reiter C. Effect of temperature on *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) development with special reference to the isomegalen- and isomorphen-diagram. *Forensic Sci Int.* 2001;120: 32–6.
17. Warren JA, Anderson GS. The development of *Protophormia terraenovae* (Robineau-Desvoidy) at constant temperatures and its minimum temperature threshold. *Forensic Sci Int.* 2013;233:374–9.
18. Clark K, Evans L, Wall R. Growth rates of the blowfly, *Lucilia sericata*, on different body tissues. *Forensic Sci Int.* 2006;156: 145–9.
19. Kaneshrajah G, Turner B. *Calliphora vicina* larvae grow at different rates on different body tissues. *Int J Legal Med.* 2004;118:242–4.
20. Day DM, Wallman JF. Influence of substrate tissue type on larval growth in *Calliphora augur* and *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae). *J Forensic Sci.* 2006;51:657–63.
21. Introna F, Campobasso CP, Goff ML, Pietro C, Lee M. Entomotoxicology. *Forensic Sci Int.* 2001;120:42–7.
22. Magni PA, Pazzi M, Vincenti M, Alladio E, Brandimarte M, Dadour IR. Development and validation of a GC-MS method for nicotine detection in *Calliphora vomitoria* (L.) (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Sci Int.* 2016;261:53–60.
23. Goff ML, Omori AI, Goodbrod JR. Effect of cocaine in tissues on the development rate of *Boettcherisca peregrina* (Diptera: Sarcophagidae). *J Med Entomol.* 1989;26:91–3.
24. Shiao SF, Yeh TC. Larval competition of *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya rufifacies* (Diptera: Calliphoridae): behavior and ecological studies of two blow fly species of forensic significance. *J Med Entomol.* 2008;45:785–99.
25. Smith KE, Wall R. Asymmetric competition between larvae of the blowflies *Calliphora vicina* and *Lucilia sericata* in carrion. *Ecol Entomol.* 1997;22:468–74.

26. Ireland S, Turner B. The effects of larval crowding and food type on the size and development of the blowfly, *Calliphora vomitoria*. *Forensic Sci Int*. 2006;159:175–81.
27. Ullyett G. Competition for food and allied phenomena in sheep-blowfly populations. *Philos Trans R Soc Lond Ser B Biol Sci*. 1950;234:77–174.
28. El-Moaty ZA, Kheirallah AEM. Developmental variation of the blow fly *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) (Diptera: Calliphoridae) by different substrate tissue types. *J Asia Pac Entomol*. 2013;16:297–300.
29. Bernhardt V, Schomerus C, Verhoff MA, Amendt J. Of pigs and men—comparing the development of *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) on human and porcine tissue. *Int J Legal Med*. 2017;131:847–53.
30. Charabidze D, Bourel B, Gosset D. Larval-mass effect: characterisation of heat emission by necrophagous blowflies (Diptera: Calliphoridae) larval aggregates. *Forensic Sci Int*. 2011;211:61–6.
31. Szpila K. Key for the identification of third instars of European blowflies (Diptera: Calliphoridae) of forensic importance. In: Amendt J, Campobasso CP, Goff ML, Grassberger M, editors. *Current concepts in forensic entomology*. Dordrecht, Heidelberg, London, New York: Springer; 2010. p. 43–56.
32. Yao H, Song J, Liu C, Luo K, Han J, Li Y, et al. Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals. *PLoS One*. 2010;5:294–9.
33. Wang Y, Naumann U, Wright ST, Warton DI. mvabund - an R package for model-based analysis of multivariate abundance data. *Methods Ecol Evol*. 2012;3:471–4.
34. Hui FKC, Taskinen S, Pledger S, Foster SD, Warton DI. Model-based approaches to unconstrained ordination. *Methods Ecol Evol*. 2015;6:399–411.
35. Sanford MR. Insects and associated arthropods analyzed during medicolegal death investigations in Harris County, Texas, USA: January 2013–April 2016. *PLoS One*. 2017;12:e0179404.
36. Reibe S, Madea B. How promptly do blowflies colonise fresh carcasses? A study comparing indoor with outdoor locations. *Forensic Sci Int*. 2010;195:52–7.
37. Martín-Vega D, Nieto C, Cifrián B, Baz A, Díaz-Aranda LM. Early colonisation of urban indoor carcasses by blow flies (Diptera: Calliphoridae): an experimental study from central Spain. *Forensic Sci Int*. 2017;278:87–94.
38. Fischer OA. Blowflies of the genera *Calliphora*, *Lucilia* and *Protophormia* (Diptera, Calliphoridae) in South-Moravian urban and rural areas with respect to *Lucilia bufonivora* Moniez, 1876. *Acta Vet Bmo*. 2000;69:225–31.
39. Smith KE, Wall R. The use of carrion as breeding sites by the blowfly *Lucilia sericata* and other Calliphoridae. *Med Vet Entomol*. 1997;11:38–44.
40. Hwang C, Turner BD. Spatial and temporal variability of necrophagous Diptera from urban to rural areas. *Med Vet Entomol*. 2005;19:379–91.
41. Knight TM, Chase JM, Goss CW, Knight JJ. Effects of interspecific competition, predation, and their interaction on survival and development time of immature *Anopheles quadrimaculatus*. *J Vector Ecol*. 2004;29:277–84.
42. Prinkkilä M, Hanski I. Complex competitive interactions in four species of *Lucilia* blowflies. *Ecol Entomol*. 1995;20:261–72.
43. Duarte JLP, Krüger RF, Ribeiro PB. Interaction between *Musca domestica* L. and its predator *Muscina stabulans* (Fallén) (Diptera, Muscidae): effects of prey density and food source abundance. *Rev Bras Entomol*. 2013;57:55–8.
44. Grassberger M, Friedrich E, Reiter C. The blowfly *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) as a new forensic indicator in Central Europe. *Int J Legal Med*. 2003;117:75–81.
45. Grassberger M, Frank C. Initial study of arthropod succession on pig carrion in a central European urban habitat. *J Med Entomol*. 2004;41:511–23.
46. Matuszewski S, Bajerlein D, Konwerski S, Szpila K. Insect succession and carrion decomposition in selected forests of Central Europe. Part 2: composition and residency patterns of carrion fauna. *Forensic Sci Int*. 2010;195:42–51.
47. de Carvahlo Queiroz MM. Temperature requirements of *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) (Diptera, Calliphoridae) under laboratory conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz Fundação Oswaldo Cruz*. 1996;91:785–8.
48. Cherix D, Wyss C, Pape T. Occurrences of flesh flies (Diptera: Sarcophagidae) on human cadavers in Switzerland, and their importance as forensic indicators. *Forensic Sci Int*. 2012;220:158–63.
49. Forbes SL, Perrault KA. Decomposition odour profiling in the air and soil surrounding vertebrate carrion. *PLoS One*. 2014;9:e95107.