



archiwum medycyny sądowej i kryminologii

Praca przeglądowa
Review paper

Sanaa M. Aly¹, Hebatalla M. Aldeyarbi²

Zastosowanie entomologii sądowej: przegląd stanu wiedzy i najnowsze doniesienia

Applications of forensic entomology: overview and update

¹Department of Forensic Medicine and Clinical Toxicology, Faculty of Medicine, Suez Canal University, Ismailia, Egypt

²Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Suez Canal University, Ismailia, Egypt

Both authors contributed equally to this work.

Streszczenie

Mimo ogromnych postępów w badaniach podstawowych i stosowanych entomologia sądowa stale się rozwija i jest uznawana za interdyscyplinarną dziedzinę wiedzy. W zestawieniu z innymi naukami prawnymi i biologicznymi publikacje z zakresu entomologii sądowej są jednak stosunkowo skromne, podobnie jak liczba entomologów sądowych. Głównym celem niniejszej pracy jest przedstawienie znaczenia entomologii sądowej przez omówienie jej zastosowań, czynności podejmowane przez entomologów mogą bowiem dostarczać istotnych informacji dotyczących czasu, miejsca i przyczyny śmierci, ułatwiać identyfikację sprawców i/lub ofiar przestępstwa, a w niektórych przypadkach także określać stan zaniedbania ofiar przed śmiercią. W pracy omówiono też możliwość wykorzystywania zdobyczy najnowocześniejszych technologii. Interdyscyplinarność prac badawczych umożliwi dalsze zgłębianie tej dziedziny, przyczyniając się do wytyczania nowych obszarów badań z korzyścią dla rozwoju nauki oraz zastosowań kryminalistycznych.

Słowa kluczowe: owady, PMI, gatunki, identyfikacja, dochodzenie przyczyny zgonu.

Abstract

Despite the great strides made in fundamental and applied research, forensic entomology is constantly growing and considered to be an interconnected scientific discipline. Indeed, there is shortage in the available scientific literature in comparison to many other legal and biological subjects as well as in the number of forensic entomologists. The main goal of this work is to clarify the importance of forensic entomology by demonstration of their applications; it can provide important information about when, where, and how a particular death occurred. It can also identify the assailant and/or the victim or might highlight in some cases, the victim's state of neglect prior to death. It also aimed to demonstrate the impact of new emerging technologies; encouraging researchers to further pursue this line of research. More multidisciplinary research would lead to better understanding and identifying novel research areas. Consequently, that could meet scientific and legal expectations.

Key words: insects, PMI, species, identification, death investigation.

Wstęp

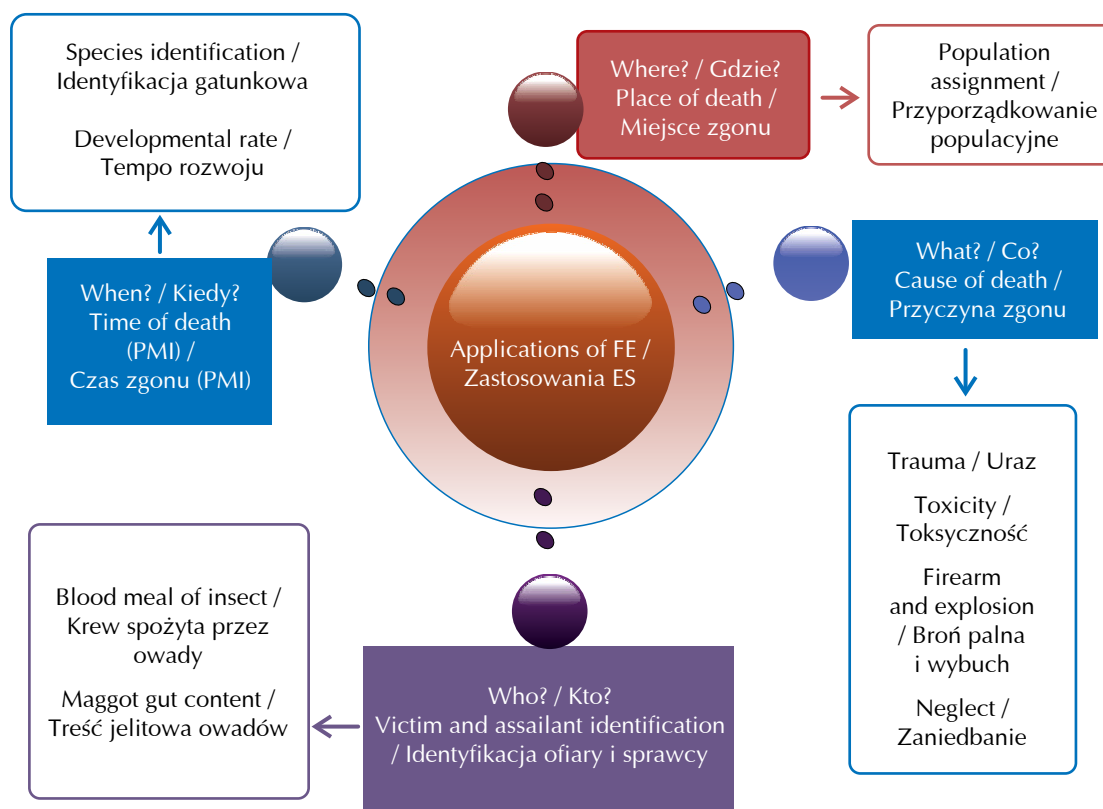
Entomologia sądowa (ES) odgrywa ważną rolę w systemach wymiaru sprawiedliwości. Na podstawie dowodów entomologicznych z miejsca popełnienia przestępstwa możliwe jest ustalenie, kiedy, gdzie i w jaki sposób nastąpił zgon. Mogą one też ułatwić ustalenie tożsamości sprawcy i/lub ofiary (ryc. 1).

Jednym z głównych zadań ES jest określenie czasu, jaki upłynął od śmierci do ujawnienia zwłok (PMI), na podstawie analizy składu gatunkowego owadów żerujących na zwłokach lub oceny stadium rozwojowego stawonogów [1, 2]. Zazwyczaj na miejscu zdarzenia zabezpiecza się owady w niedojrzałych stadiach i wykorzystuje je jako „zegar biologiczny” w celu ustalenia minimalnego PMI [3]. Dowody entomologiczne pozwalają też na przyporządkowanie zebranych osobników do określonych lokalizacji geograficznych [4]. Badania molekularne i toksykologiczne owadów mogą ułatwiać ustalenie przyczyny śmierci [1]. Owady hematofagiczne i nekrofagiczne są przydatne w identyfikacji zarówno

Introduction

Forensic entomology (FE) plays a great role in criminal justice system. Entomological evidence at a crime scene can provide important information about when, where, and how a particular death occurred. It can also identify the assailant and/or the victim (Fig. 1).

One of its principle application is the determination of time since death or post-mortem interval (PMI), in suspicious death cases, either via insect species composition on the corpse or assessing the arthropods development rates [1, 2]. Typically, at crime scene the immature stages are collected and used as biological clock to determine the minimum PMI [3]. Entomological evidence would be useful in assigning specimens to certain geographic locations [4]. Molecular and toxicological examinations of these insects could help also in identifying the cause of death [1]. All haematophagous and necrophagous insects are valuable in human identification (victim and assailant) or might highlight in some cases, the



Ryc. 1. Zastosowania entomologii sądowej (ES)

Fig. 1. Applications of forensic entomology (FE)

ofiary, jak i sprawcy przestępstwa, mogą również pomóc w ocenie stanu zaniedbania ofiary przed śmiercią (zwłaszcza osób w podeszłym wieku) [5].

Zastosowanie jakiejkolwiek metody wymaga uprzedniej walidacji – zarówno pod względem naukowym, jak i prawnym. Celem walidacji jest potwierdzenie, że metoda spełnia kryteria odporności, niezawodności i odtwarzalności. Kwestię dopuszczalności dowodów regulują określone zasady, które różnią się w zależności od systemu prawnego obowiązującego w danym kraju. Zasadniczo dowody naukowe muszą spełniać tzw. kryteria Dauberta, tzn. muszą zostać przetestowane, poddane ocenie specjalistów w danej dziedzinie (proces *peer review*), opublikowane, zweryfikowane pod kątem wiarygodności i potencjalnych błędów, a także powszechnie akceptowane w środowisku naukowym [2]. Cele te można osiągnąć przez stosowanie najlepszych praktyk [6] i zapewnienie jakości [7].

Z punktu widzenia medycyny sądowej nie ma idealnego podejścia, a wybór konkretnej metody jest uzależniony od wielu czynników, m.in. badanego zagadnienia, kwestii finansowych, zasobów laboratoryjnych i ograniczeń czasowych. Należy wziąć pod uwagę wszystkie te elementy [8]. W pracy omówiono różne zastosowania ES oraz wpływ nowych technologii na rozwój tej dziedziny.

Czas od chwili zgonu

Od entomologów sądowych często oczekuje się szacowania minimalnego i maksymalnego PMI (PMI_{\min} i PMI_{\max}), czyli czasu, jaki upłynął między zgonem a ujawnieniem zwłok, na podstawie dostępnych w ludzkich szczątkach dowodów dostarczanych przez stawonogi. Niektóre źródła określają ten okres jako najwcześniejszy termin owipozycji (EOD), ponieważ składanie jej przez owady może następować zarówno przed śmiercią gospodarza (np. w muszycy), jak i po zgonie. Oznacza to, że PMI i EOD mogą mieć różne wartości [9]. W literaturze istnieje wiele terminów opisujących jeden lub kilka aspektów okresu aktywności owadów (PIA) oraz PMI, co może być mylące. Brak jednolitej nomenklatury wpływa na praktykę medyczno-sądową i badania podstawowe, istnieje więc potrzeba wprowadzenia znormalizowanej terminologii [10]. Szacowanie PMI opiera się ponadto na pewnych założeniach, co może prowadzić do znacznych rozbieżności między

victim's state of neglect prior to death especially in elderly persons [5].

However, any method needs to be validated before using in any forensic applications. It is mandatory requirement at both scientific and legal levels. With considerations that validation is an important process for demonstration that method is robust, reliable, and reproducible. The admissibility of evidence in the legal system is governed by different rules which also need to be met. These vary according to the legal systems in different countries. As general, scientific evidence must fulfil “Daubert standards” under which scientific methods must have been tested before, subjected to peer review and publication, verified the reliability of the technique, estimated potential error, and obtained widespread acceptance in the scientific community [2]. This could be obtained by the commitment with best practice procedures [6] and quality assurance [7].

Critically, from a forensic point of view, there is no perfect method and the reason for the choice of a particular method is often depends on several of factors as: the research question investigated, financial constraints, laboratory resources and time limitations. However, all points must be examined carefully to evade unsuitable choices [8]. Here we review the different applications of FE with the impact of new emerging technologies.

Time passed since death

Forensic entomologists are frequently asked to estimate the minimal and maximal PMI (PMI_{\min} and PMI_{\max}) between death occurrence and corpse discovery by arthropod evidence recovered from human remains. Actually this time is referred in some references to the earliest oviposition date (EOD), which is more precise as the eggs may be laid before death (as in myiasis) or afterwards. Thus, PMI and EOD might not be identical [9]. A wide variety of terms to describe one or more aspects of the period of insect activity (PIA) and PMI have been used in literature adding confusion in forensic practice and basic research. The need of a common language for practitioners and researchers in the field become mandatory, a sort of standardized terminology to be used in all situations [10]. Nonetheless, arthropod-based PMI predictions are recognized to be connected with a number of assumptions that may

dzy ustalonym a faktycznym PMI [2]. Większość dowodów pochodzi z dwóch zależnych od czasu procesów: sukcesji stawonogów na zwłokach oraz rozwoju stadiów preimaginalnych owadów. Stawonogi pojawiają się na padlinie w określonej sukcesji lub sekwencji, gdyż poszczególne etapy rozkładu zwłok przyciągają różne grupy owadów [11]. Sukcesja stawonogów na zwłokach została potwierdzona doświadczalnie w rozmaitych warunkach otoczenia [12, 13]. Wyjaśnia to różnice w jej schemacie w zależności od pory roku, położenia geograficznego i typu siedliska [11]. Informacje zgromadzone na podstawie modeli zwierzęcych mogą mieć przełożenie na przypadki kryminalne i służyć jako baza danych dotyczących entomofauny w określonym siedlisku [14]. W niektórych krajach nie ma jednak literatury na ten temat lub jest ona skąpa [15].

Identyfikacja gatunkowa

Prawidłowa identyfikacja gatunkowa owadów zasiedlających zwłoki ma kluczowe znaczenie, ponieważ dostarcza informacji przydatnych przy szacowaniu czasu zgonu [16].

Identyfikacja morfologiczna

W analizach taksonomicznych i identyfikacyjnych najczęściej wykorzystuje się cechy zewnętrzne lub wewnętrzne organizmów [8]. Nieprawidłowo zabezpieczone próbki, a także duże podobieństwo większości preimaginalnych stadiów rozwojowych (jaj, larw, poczwerek) i fragmentów owadów mogą jednak utrudniać identyfikację [17–22]. Mimo zwiększonej dokładności identyfikacji gatunków na poziomie morfologicznym dzięki analizom wykonywanym za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) podobne cechy stwierdzano u gatunków należących do różnych rodzin: plujkowatych (*Calliphoridae*), ścierwicowatych (*Sarcophagidae*) i muchowatych (*Muscidae*) [23]. Znaczna plastyczność morfologiczna między gatunkami siostrzanymi a organizmami należącymi do tego samego gatunku może być myląca [8]. Z kolei hodowla wymaga zebrania żywych larw i utrzymywania ich w warunkach odpowiednich do dalszego rozwoju, co bywa czasochłonne i nie zawsze jest skuteczne [24]. Ponadto brak kluczy taksonomicznych dla owadów o istotnym znaczeniu z punktu widzenia medycy-

lead to serious deviations from the true PMI if violated [2]. The bulk of its evidence derives from two time-dependent processes: carrion-arthropod succession and the development of immature insects. Arthropods visit carrion in sequential waves in a typical succession or sequence, where each stage of decomposition is attractive to a different group of insects [11]. The succession has been experimentally shown on carrions in several countries and under a variety of conditions [12, 13]. This can explain the difference in pattern of succession on the carrion in different regions depending on the year season, geographic location and habitat [11]. The experimental data on animal models seem to be applicable to actual forensic cases and can act as a valid database of entomofauna in the same habitat [14]. There is no or little literature about geographical distribution of forensically important species in some countries [15].

Species identification

Valid species identification of insects inhabiting the carcass is crucial from the forensic perspective as it provides information useful in estimating the time of death [16].

Morphological identification

The external or internal features of an organism are most utilized process in both taxonomy and identification [8]. However, in morphology-based approaches, badly preserved samples, the similarity of most immature stages (such eggs, larvae or pupae) or insect fragments are considered the major challenges in species identification [17–22]. In spite of the improve accuracy in identification of insect species on morphological level via scanning electron microscope (SEM), alike features were found in species belonging to *Calliphoridae*, *Sarcophagidae* and *Muscidae* [23]. Nonetheless, the significant morphological plasticity between sibling species and organisms of the same species can make identification difficult and even puzzling [8]. Rearing requires larvae to be collected live and kept in conditions suitable for continued development which can be time consuming and the success is not guaranteed [24]. Even if the investigator jumps over this challenge, taxonomic keys might be not available for all forensic important insects [16, 22, 25–27]

ny sądowej [16, 22, 25–27] może powodować błędy w identyfikacji. Jedną z przyczyn jest uwzględnianie tylko kilku cech morfologicznych wynikających ze zbieżnej ewolucji podobnych fenotypów u niepowiązanych filogenetycznie organizmów [28]. Dlatego identyfikacja na podstawie DNA jest uznawana za bardziej wiarygodną niż klasyczne podejście morfologiczne.

Innym narzędziem różnicującym jest morfometria. Zajmuje się badaniem ilościowym wielkości i kształtu obiektów biologicznych oraz ich kowariancji. W entomologii często wykorzystuje się analizę geometryczno-morfometryczną skrzydeł owadów ze względu na jej prostotę, niski koszt i dużą wiarygodność. Wielkość skrzydeł może zależeć od czynników środowiskowych, nie sprawdza się więc jako kryterium różnicujące muchówki z rodziny plujkowatych, natomiast ich kształt stanowi stabilną cechę informującą o zależnościach filogenetycznych i ewolucyjnych między organizmami. Na jej podstawie możliwe jest różnicowanie plujkowatych na poziomie rodzaju i gatunku. Analiza morfologii skrzydeł jest niezawodną techniką klasyfikacji niektórych gatunków (*Chrysomya*), choć bywa znacznie mniej precyzyjna przy różnicowaniu innych muchówek (*Lucilia* i *Hemipyrellia*) [29].

Identyfikacja molekularna (markery i metody)

Sperling jako pierwszy zaproponował metodę opartą na DNA mitochondrialnym (mt) jako alternatywę dla kluczy morfologicznych do identyfikacji gatunków służących szacowaniu PMI [30]. Od tego czasu powstało wiele metod typowania za pomocą jednego lub większej liczby markerów oraz rozmaitych technik.

Markery mitochondrialne

Genom mt składa się z setek kopii dwuniciowego DNA zamkniętych otoczką lipidową. Odpowiada za kodowanie kluczowych podjednostek łańcucha transportu elektronów obecnych w centrach energetycznych komórek eukariotycznych. Szybsze tempo mutacji mtDNA oznacza, że u blisko spokrewnionych gatunków może występować znaczna zmienność sekwencji, jest więc przydatne przy identyfikacji, a także w badaniach ewolucyjnych, takso-

and false identification can also be encountered. This can occur if only few morphological features are taken into consideration due to the presence of convergent evolution with similar phenotypes in phylogenetic unrelated parasites [28]. Thus, DNA-based approach in identification is considered to be more advantageous than the classical morphology approach.

Besides classical morphological and DNA based identification, the use of morphometrics has been suggested as a valuable tool for discrimination. Morphometrics involves the quantitative studies of biological size and shape, with its covariation. The geometric morphometric analysis of insect wings is well known in entomology, due to its low costs, high reliability and simplicity. The wing size is easily affected by environmental factors and cannot be used to separate blow fly species. In contrast, wing shape showed to be a stable character compared to size and very informative on the phylogenetic and evolutionary relationship of organisms. The wing shape could be used to separate blow flies at both the genus and species level. The wing morphology (based on a landmark characterization) is a reliable technique for classifying some species (*Chrysomya*), but a much less precise technique to separate others (*Lucilia* and *Hemipyrellia*) [29].

Molecular identification (markers and methods)

Sperling work was the first to propose the DNA-based approach – mitochondrial (mt) DNA – as an alternative to morphological keys for species identification used for PMI estimation [30]. Since that time, many DNA-based typing approaches were used which depend on single or multiple markers of different origin and using different techniques as described in the following section.

Mitochondrial markers

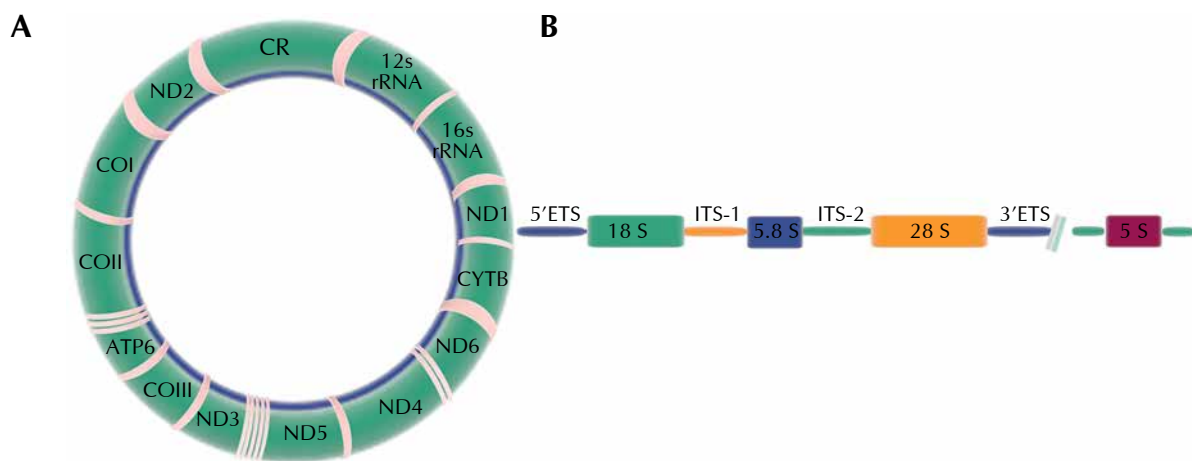
Mitochondrial genome comprise of a double-stranded DNA present in hundreds of copies surrounded by a lipid envelope; dedicated to the coding of key subunits of the electron transport chain present in the powerhouses of eukaryotic cells. The accelerated mutation rate of mitochondrial DNA signifies that considerable amounts of se-

nomicznych i kryminalistycznych stawonogów oraz kręgowców [8, 31, 32]. mtDNA jest dziedziczone od jednego rodzica (w linii żeńskiej), co zapewnia wysoką rozdzielczość analizy. U różnych gatunków można je amplifikować bez klonowania, co ułatwia interpretację [33]. Popularność metody wynika w dużej mierze ze stosunkowo prostej izolacji, zwłaszcza w przypadku próbek zdegradowanego lub bardzo starego DNA, ponieważ mtDNA występuje w komórce w kilku kopiach. Pod tym względem ma więc przewagę nad metodami opartymi na genomie jądrowym z zachowaną sekwencją i strukturą w różnych taksonach [34, 35].

Głównym ograniczeniem stosowania markerów mt do określania gatunku jest możliwość introgresji hybrydowej [36, 37], a także zmienność mtDNA na poziomie wewnątrz- i międzygatunkowym, jak u gatunków zarażonych bakterią *Wolbachia* [38]. mtDNA obejmuje regiony kodujące białko w postaci 2 sekwencji genów kodujących rRNA (16S i 12S), 22 cząsteczki transferowego RNA (tRNA), cytochrom b (CYTB), podjednostki I–III oksydazy cytochromu c (CO I–III), inne otwarte ramki odczytu kodujące podjednostki dehydrogenazy NADH (ND1–6 i ND4L) oraz region niekodujący zwany regionem kontrolnym (CR) lub pętlą D [39, 40] (ryc. 2A). Co ciekawe, *Chrysomya chloropyga* – jeden z gatunków muchówek z rodziny plujkowatych – zawiera 23

sequence variation might be present in closely related species; making it a useful characteristic for species identification procedures as well as evolutionary, taxonomic and forensic investigations in arthropods and vertebrates in general [8, 31, 32]. The mtDNA is uniparentally (maternally) inherited, a fact that greatly provides a high level of resolution, can be easily amplified without cloning in a variety of species and simplifies the results interpretation [33]. Moreover, its popularity derives in large part from its relative easy isolation especially in degraded or ancient DNA samples as it is found in several copies per cell; providing an obvious advantage over the nuclear genome-based approaches with conserved sequence and structure across taxa [34, 35].

The most significant limitations of using mitochondrial markers in the definition of species is the possibility of hybrid introgression [36, 37], mtDNA variation at the intra- or interspecific level as in *Wolbachia*-infected species [38]. The mtDNA includes protein-coding regions as two rRNA-encoding gene sequences (16S and 12S), 22 transfer RNAs (tRNAs), cytochrome b (CYTB), cytochrome c oxidase subunits I–III (COI–III), other open reading frames encode subunits of the NADH dehydrogenase subunits (ND1–6 and ND4L) and non-coding region called the control region (CR) or D-loop [39, 40] (Fig. 2A). Interestingly, *Chrysomya chloropyga* – one of the fo-



Ryc. 2. Schematyczne przedstawienie genów mtDNA i rRNA. **A)** Mapa mitochondrialnego DNA owadów (mtDNA). **B)** Układ genów rybosomalnego RNA (rRNA) w genomie organizmów eukariotycznych. Klastry 18S, 5.8S i 28S rRNA oraz 5S, które u większości eukariontów występują w odrębnych matrycach

Fig. 2. Diagrammatic representation of mtDNA and rRNA genes. **A)** Map of the insect mitochondrial DNA (mtDNA). **B)** Eukaryotic genomic organization of ribosomal RNA (rRNA) genes. Each cluster 18S, 5.8S and 28S rRNA as well as 5S which usually exist in most of eukaryotes in separate arrays

geny tRNA w genomie mt zamiast tradycyjnych 22 genów opisanych dla rzędu *Diptera* [41]. U kręgowców analizowanymi *loci* są głównie CYTB i COI, natomiast u owadów bada się fragmenty COI i COII [39, 40].

Gen COI wykazuje większy zakres sygnału filogenetycznego niż alternatywne geny o większej szybkości ewolucji molekularnej [42]. Zbadano go u kilku gatunków muchówek z rodzin *Calliphoridae*, *Sarcophagidae* i *Muscidae* [24, 25, 43–45]. Zaproponowano też globalny system bioidentyfikacji wszystkich gatunków zwierząt na podstawie „kodów kreskowych DNA” (barcodów) obejmujących gen COI [42]. Barcoding był wykorzystywany w badaniach stawonogów (m.in. muchówek z rodziny plujkowatych) [46, 47]. W niedawnej analizie zaproponowano włączenie tej metody do technik stosowanych w ES [47] zgodnie z zaleceniami obowiązującymi w innych krajach [48, 49]. Analiza COI zakończyła się jednak niepowodzeniem m.in. w przypadku gatunków, u których stwierdzono taksony parafiletyczne (*C. putoria* i *C. chloropyga*) [50], introgresję mtDNA związaną z zakażeniem bakterią *Wolbachia* (*Protocalliphora*) [38], zdarzenie hybrydizacyjne (*L. sericata* i *L. cuprina*) [36, 37, 51], niewystarczającą zmienność między gatunkami (*Calliphora* spp.) [16] lub niezgodność drzewa filogenetycznego z tradycyjną klasyfikacją morfologiczną [17, 24, 46, 52].

Mimo że gen COII jest bardzo przydatny w badaniach populacyjnych i ewolucyjnych [39], tylko nieliczni autorzy analizowali jego użyteczność w medycynie sądowej [27, 52]. Potwierdzono, że fragment 635-pz genu COII umożliwia różnicowanie blisko spokrewnionych gatunków o spójnym drzewie filogenetycznym [16, 53].

Bezpośrednie sekwencjonowanie genu 16S uznano za swoisty i stabilny marker służący identyfikacji gatunkowej. Charakteryzuje się on mniejszą zmiennością wewnątrzgatunkową niż większość genów kodujących białka, dlatego jest powszechnie stosowany do opracowywania drzew filogenetycznych [54]. Analiza sekwencyjna genu mt 16S lub 12S rRNA może ujawniać istotne substytucje nukleotydów przydatne zwłaszcza przy identyfikacji muchówek z rodzin *Calliphoridae* i *Muscidae* [55, 56]. Ze względu na niski stopień zmienności międzygatunkowej rozróżnienie blisko spokrewnionych gatunków wymaga jednak sekwencjonowania większego fragmentu regionu 16 [56]. Z drugiej strony Cameron i wsp.

rensally important blow fly species – was reported to contain 23 tRNA genes within their mitochondrial genome instead of the usual 22 already described for *Diptera* [41]. For vertebrates, the loci of choice is being either mainly the CYTB or the COI, however, for insects the COI and COII are indeed the mitochondrial genes of choice [39, 40].

The COI gene seems to have a greater range of phylogenetic signal than alternatives with a higher rate of molecular evolution [42]. COI gene of different lengths has been extensively investigated in several *Calliphoridae*, *Sarcophagidae*, and *Muscidae* [24, 25, 43–45]. A global bioidentification barcoding system for all animal species has been proposed based on the mtDNA COI gene [42] and was lately used for arthropods as blow fly species [46, 47]. Recent Brazilian study recommended the inclusion of DNA barcoding in the forensic entomological identification [47], as has been recommended for other countries [48, 49]. Nevertheless, several studies showed failure of COI in occasions where species paraphyly was encountered as in *Chrysomya putoria* and *C. chloropyga* [50], *Wolbachia*-associated mtDNA introgression as *Protocalliphora* [38], hybridization event as *Lucilia sericata* and *L. cuprina* [36, 37, 51], inadequate variability between species as *Calliphora* spp. of southern Australia [16] or inconsistent phylogenetic tree with traditional morphological classification [17, 24, 46, 52].

Although the COII gene is very useful for population genetics and evolution studies [39], only few studies have investigated the utility of that region [27, 52]. It is elucidated that the 635-bp COII fragment has high discriminating power in differentiation of closely related species with consistent phylogenetic tree [16, 53].

Direct sequencing of 16S has approved to be a specific and stable marker for species identification. It was reported that 16S has lower intraspecific variability than most protein coding genes. Therefore, it is commonly used to construct phylogenetic trees [54]. The sequence analysis of mitochondrial 16S or 12S rRNA gene can reveal abundant phylogenetically informative nucleotide substitutions for identification in *Insecta* especially *Calliphoridae* and *Muscidae* families [55, 56]. However, due to low interspecific variation, sequencing of a larger fragment of 16 region is required to discriminate between closely allied species [56]. On the other hand,

zalecają zwiększoną ostrożność przy badaniu genów rRNA. Wniosek ten wynika z analizy topologii drzew na podstawie genów rRNA, która wykazała rozbieżności z uprzednio ustalonymi powiązaniem filogenetycznymi w obrębie rodzaju *Diptera*. Inne trudności związane z wykorzystaniem genów rRNA w analizie filogenetycznej to międzygenomowa heterogenność sekwencji niektórych genów rRNA oraz brak spójnej adnotacji w sekwencjonowanych mt genomach owadów, co powoduje konieczność stosowania w celach porównawczych funkcjonalnych metod adnotacji genów mtrRNA bazujących na analizie struktury druzgrodowej [57].

Główną funkcją CYTB jest identyfikacja próbek biologicznych pochodzących od kręgowców [58]. W sekwencji CYTB niektóre miejsca ewoluują powoli, a inne szybko, co ułatwia badanie głębszych zależności i może poprawiać skuteczność identyfikacji gatunków [54]. De Pablo i wsp. wykazali, że choć marker ten jest rzadko stosowany, odzwierciedla on różnice genetyczne w obrębie gromady *Insecta*, które są na tyle istotne, że umożliwiają różnicowanie do poziomu gatunku. Właściwość tę można łączyć z umiejscowieniem CYTB w genomie mt [59].

CR stanowi największą niekodującą część genomu mt określaną jako „region bogaty w A+T” u bezkręgowców lub „pętla D” u kręgowców [60]. Zawiera on wiele istotnych elementów regulatorowych odpowiedzialnych za transkrypcję i replikację mtDNA [61]. Hua i wsp. wysunęli hipotezę, że w obrębie gromady *Insecta* regiony CR nie zawsze stanowią część genomu mt o najwyższej zawartości AT, a ich wielkość różni się w zależności od taksonu [62]. U stawonogów CR często mają kilka lub wszystkie spośród 4 motywów: długą sekwencję tyminy, podregion o jeszcze większej zawartości A+T, sekwencje powtórzone tandemowo oraz struktury w postaci tzw. spinek do włosów [63]. Mimo że region dostarcza ważnych informacji, w niedawno przeprowadzonym badaniu nie udało się bezpośrednio zsekwencjonować CR mtDNA u muchówek z rodzaju *Chrysomya*, co wskazuje na heteroplazmię. Niezbędne było klonowanie produktów amplifikacji CR przed sekwencjonowaniem – inne regiony są pod tym względem mniej problematyczne (np. COI czy ITS2) [64]. W niektórych badaniach amplifikacja CR u muchówek z rodzaju *Chrysomya* – *C. albiceps*, *C. bezziana*, *C. chloropyga*, *C. megacephala* i *C. rufifacies* – wykazała obecność dwóch

Cameron *et al.* elucidated that rRNA genes possibly warrant more caution in their use. This conclusion based on the tree topologies derived from the rRNA genes which disagree with previously accepted dipteran phylogenies. An additional difficulties associated with using rRNA genes in phylogenetic analysis included intergenomic sequence heterogeneity of certain rRNA genes and the lack of consistent annotation across sequenced insect mt genomes that urges for functional methods of annotation of mtrRNA genes based on secondary structure analyses for comparison [57].

The main usage of CYTB is in identifying biological specimens from diverse vertebrate animals [58]. Within CYTB sequences, there are some sites evolve slowly whereas others evolve rapidly that facilitate the investigation of deeper relationships and can improve species identification [54]. De Pablo and his colleagues showed that although the use of CYTB is rare but this marker contains genetic difference within the order *Insecta* which are high enough to help differentiation at the species level. This could be attributed to the location of CYTB gene on the mitochondrial genome [59].

The CR is largest non-coding portion of the mt genome that is usually known as “A+T-rich” or “D-loop” region for invertebrates and vertebrates respectively [60]. This hypervariable region possesses a number of essential regulatory elements responsible for transcription and replication of mtDNA [61]. Hua *et al.* have proposed that in *Insecta* CR were not constantly the most AT-rich part of the mt genome – as previously known – and its size varies considerably in different taxa [62]. In arthropods, the CRs often have any or all of these 4 motifs: a long sequence of thymines, subregion of an even higher A+T content, tandemly repeated sequences, and stem-loop structures [63]. Though, this region is informative, recent study had revealed that the direct sequencing of mitochondrial CR of *Chrysomya* was unsuccessful, consistent with the presence of heteroplasmies. Thus, cloning of amplification products of CR prior to sequencing was required in contrast to other regions as COI or ITS2 which appear to be less problematic [64]. In several studies, amplification of the control region of *Chrysomya* genus – *C. albiceps*, *C. bezziana*, *C. chloropyga*, *C. megacephala* and *C. rufifacies* – had revealed the presence of two copies of the tRNA^{le} and partial duplication of tRNA-

kopii tRNA^{Ile} i częściową duplikację genów tRNA^{Gln} [43, 64–66]. Rearanżacja genu tRNA nie ogranicza się najprawdopodobniej do rodzaju *Chrysoma*. Analiza sekwencji CR u gatunków *Calliphora dubia* i *Phormia regina* potwierdziła występowanie duplikacji genów tRNA^{Ile} i tRNA^{Gln} w tej samej lokalizacji genomowej [65]. Z drugiej strony analogiczna analiza sekwencji CR u innych przedstawicieli rodziny *Calliphoridae* (*Lucilia* i *Cochliomyia*) nie wykazała takiej duplikacji [41]. Zmienna domena CR u niektórych *Calliphoridae* może więc być tzw. gorącym miejscem rearanżacji genowych w mtDNA [63]. Duplikacje te mogą stanowić konserwatywną cechę gatunków należących do rodziny *Calliphoridae* i być przydatnym markerem zwłaszcza przy identyfikacji larw – ze względu na brak diagnostycznych cech morfologicznych w tym stadium rozwoju [41, 65].

Konieczne jest opracowanie bazy danych DNA różnych gatunków stawonogów. Rozszerzenie zakresu genów mt wykorzystywanych do analizy muchówek nekrofagicznych wymaga sekwencjonowania całych genomów mt i porównania zmienności w poszczególnych regionach [45]. W 2015 r. wykazano, że sekwencjonowanie nowej generacji (NGS), inaczej sekwencjonowanie o wysokiej przepustowości (HTS), pozwala uzyskać kompletne genomy mt u muchówek (*C. hominivorax*, *H. irritans*, *P. regina* i *S. crassipalpis*) bez konieczności stosowania konwencjonalnych technik molekularnych, takich jak reakcja łańcuchowej polimerazy (PCR) i klonowanie, co potwierdza przydatność tej metody u stawonogów [67]. Umożliwia ona analizę wielu osobników i generowanie dużych zbiorów danych. Choć nie została jeszcze w pełni przetestowana, w przyszłości może stać się ważnym narzędziem w badaniach na szerszą skalę [68, 69].

Markery jądrowe

Układ genomowy rybosomalnego DNA (rDNA) charakteryzuje się dużą spójnością [41], ale jest różny u eukariontów i prokariontów. Większość organizmów eukariotycznych ma wiele kopii poszczególnych klastrów rDNA w powtórzeniach tandemowych. Każdy klastrowy zawiera regiony 5.8S, 18S i 28S z ITS1 i ITS2 po obu stronach genu 5.8S, natomiast gen 5S występuje w odrębnych matrycach powtórzeń (ryc. 2B) [8, 70]. Części rDNA kodujące konserwatywne podstawowe rRNA (18S, 5.8S i 28S)

^{Gln} genes [43, 64–66]. Indeed, the rearrangements of tRNA gene seem not to be limited to *Chrysoma*. Analysis of the control region sequence of *Calliphora dubia* and *Phormia regina* confirmed the occurrence of the tRNA^{Ile} and tRNA^{Gln} genes duplication at the same genomic location in this *Calliphoridae* as well [65]. Nonetheless, the same analysis for CR sequences in other genera of *Calliphoridae*, as *Lucilia* and *Cochliomyia* revealed no such duplication [41]. It seems that the variable domain of the CR of some of *Calliphoridae* species might be a hot spot for gene rearrangements in mtDNA [63]. These duplications may be a conserved trait in *Calliphoridae* species and could be a useful molecular marker especially for larval identification, owing to the lack of diagnostic morphological traits in this developmental stage [41, 65].

The establishment of a comprehensive DNA database, which provides coverage for arthropod species, is mandatory. It is suggested that for improving the range of mitochondrial genes that may be utilized in forensically important necrophagous flies, sequencing the whole mt genomes from different species and comparisons of variation within each gene region are desperately needed [45]. In 2015, the dream becomes a truth as the utility of next generation sequencing (NGS) or high throughput sequencing (HTS) was demonstrated to obtain complete mitochondrial genomes for dipterans (*C. hominivorax*, *H. irritans*, *P. regina* and *S. crassipalpis*) without the aid of conventional molecular techniques such as polymerase chain reaction (PCR) and cloning and validates this method of mt genome sequencing in arthropods [67]. The application of HTS enables the analysis of huge numbers of individuals as a whole and the generation of large datasets. Although this method was only tested on a small-scale, it is clear that HTS is an important tool for future large scale purposes [68, 69].

Nuclear markers

The genomic arrangement of ribosomal DNA (rDNA) is one of greater consistency that considered in comparative genomic studies [41]; however, it is somewhat different in eukaryotes and prokaryotes. The majority of eukaryotes contain many copies of each rDNA cluster presented in tandem repeats. Each cluster includes the 5.8S, 18S and 28S

gromadzą mutacje w wolnym tempie, dlatego do różnicowania odlegle spokrewnionych gatunków zwykle wykorzystuje się różnice w konserwatywnym rDNA. Z kolei niekonserwatywne części rDNA (ITS), które zazwyczaj nie kodują funkcji podstawowych, stosunkowo szybko gromadzą mutacje, a zmienność w tym regionie może służyć różnicowaniu blisko spokrewnionych gatunków [71]. Dlatego sekwencje rDNA mają dużą wartość informacyjną [72]. W badaniach na muchówkach (*Diptera*) i błonkówkach (*Hymenoptera*) regiony ITS1, ITS2 i 28S były zdominowane przez kompleksy w ramach blisko spokrewnionych i kryptycznych gatunków [22, 39, 73, 74]. Większość istotnych informacji w obrębie regionu 28S znajdowała się w pozycjach nukleotydowych 511–710 i 1521–1830. Analiza tych dwóch podregionów była spójna z analizą filogenetyczną obejmującą całą długość genu 28S (2148 nukleotydów), co sugeruje, że podregiony mogą zapewnić wiarygodną identyfikację filogenetyczną bez konieczności badania całego regionu. Choć ostateczna identyfikacja niektórych gatunków (*L. illustris* i *L. caesar*) wymaga analizy całego genu 28S [22], porównanie zmienności sekwencji rDNA u *Drosophila* wykazało, że koniec 3' intronu ITS1 i koniec 5' intronu ITS2 są wysoce konserwatywne i sekwencyjnie identyczne u wszystkich gatunków [75]. Przeprowadzono też kilka molekularnych badań filogenetycznych na muchówkach z rodziny plujkowatych z wykorzystaniem jako markera molekularnego wewnętrznej sekwencji transkrybowanej ITS2, która również została pomyślnie zsekwencjonowana [76, 77]. Sekwencja ITS2 wydaje się wysoce konserwatywna – w przeciwieństwie do sekwencji ITS1, która wykazuje znaczną zmienność, podlega szybkim zmianom ewolucyjnym i niełatwo ulega amplifikacji [70, 77]. Potencjalne trudności związane z analizą genów jądrowych to m.in. niewielka liczba kopii i heterozygotyczność, które utrudniają amplifikację, a także duża liczba dużych intronów wymagających stosowania metody PCR z odwrotną transkryptazą [39].

Strategia wielomarkerowa

Wykorzystywanie wyłącznie pojedynczego *locus* genu do identyfikacji owadów nie jest pozbawione ryzyka [78]. Powiązania filogenetyczne określone na podstawie pojedynczego *locus* wyprowadzają jedynie

regions with ITS1 and ITS2, either side of the 5.8S gene, whereas the 5S gene exists in separate repeat arrays (Fig. 2B) [8, 70]. Parts of rDNA coding for conserved essential rRNA (18S, 5.8S, and 28S) accumulate mutations slowly. Therefore differences in conserved rDNA are usually used to differentiate distantly related species. On the other hand, the non-conserved parts of rDNA (ITS) which normally do not code for essential functions, accumulate mutations relatively rapidly and variation in this region could be used to distinguish closely related species [71]. Thus, the rDNA sequences have proven highly informative [72]. The ITS1, ITS2 and 28S regions were dominated in *Diptera* and *Hymenoptera* studies within closely related and cryptic species complexes [22, 39, 73, 74]. The majority of the informative phylogenetic information within the 28S region was located within two distinct regions of the gene fragment, nucleotide positions 511–710 and 1521–1830. Analysis of these two smaller subregions was consistent with the phylogenetic analysis of length of the entire 28S gene (2148 nucleotides), suggesting that the subregions would be able to provide a reliable phylogenetic identification without the need to analyse the entire region. While it is noticed that definitive identification of some species (*L. illustris* and *L. caesar*) requires the analysis of the entire 28S gene [22]. Comparison of sequence variation of rDNA in *Drosophila* demonstrated that the 3' end of ITS1 and the 5' end of ITS2 were highly conserved, showing sequence identity across all species [75]. Several molecular phylogenetic studies have been conducted on blow flies, based on transcribed spacer ITS2 molecular marker that was also successfully sequenced [76, 77]. The ITS2 sequence appears to be highly conserved opposed to ITS1 which showed to be quite variable as seem to undergo rapid evolutionary changes and been amplified with great difficulty [70, 77]. Nonetheless, potential difficulties might be encountered when working with nuclear genes are: low copy number and heterozygosity that hamper amplification or large content of large introns which require reverse transcriptase PCR method [39].

Multi-marker approach

It became clear that the exclusive use of single gene locus for DNA-based identification of forensic insects is not without risks [78]. Single locus

zależności ewolucyjne dla konkretnego genu i mogą nie odzwierciedlać faktycznej filogenezy gatunków z powodu niepełnego sortowania linii genealogicznych lub poziomego transferu genów w analizowanym *locus* [3]. Zależności filogenetyczne u muchówek z rodziny plujkowatych ustalone na podstawie genów jądrowych i mt wykazały sprzeczne powiązania ewolucyjne. Z tego względu konieczne jest zastosowanie strategii wielogenowej, która umożliwi analizę wielu niezależnych lokalizacji w obrębie genomów [79–81]. Wskazuje się, że połączona analiza fragmentów mtDNA zapewnia większą dokładność identyfikacji gatunków niż analiza pojedynczego fragmentu genu COI [82]. Do tej pory przeprowadzono niewiele badań filogenetycznych służących identyfikacji muchówek [71, 83]. Najczęściej analizowana kombinacja to COI i COII – stosunkowo szybko ewoluujący marker przydatny w badaniach gatunków, które dopiero niedawno uległy rozdzieleniu [16, 20, 39, 83–86]. Zaidi i wsp. ustalili, że zmienność międzygatunkowa segmentów mtDNA obejmujących CYTB, COI i ND5 może być wykorzystywana w analizach filogenetycznych gatunków z rodziny plujkowatych [70]. Istnieją doniesienia dotyczące skuteczności analizy regionu ITS2 jako badania uzupełniającego analizę COI w przypadkach niejednoznacznej identyfikacji [76]. Rozbieżność w drzewach filogenetycznych opartych na pojedynczych genach (COI lub ND5) zmniejszyła się po połączeniu obu fragmentów genów [79, 81]. Z kolei w innym badaniu oznaczenie oparte na kombinacjach fragmentów genowych zakończyło się niepowodzeniem – analiza COI, COII i ND4 wykazała niejednoznaczność identyfikację znacznej części próbek [81].

Analiza RFLP markera molekularnego (PCR-RFLP)

Do identyfikacji można wykorzystać unikatowe wzory prążkowe opracowane dla każdego blisko spokrewnionego gatunku w procesie trawienia restrykcyjnego. Metoda jest uznawana za tanią i szybką alternatywę dla metod sekwencyjnych. Mimo obaw, że zróżnicowanie wewnątrzgatunkowe może wpływać na wyniki RFLP, a mutacje punktowe mogą zmieniać miejsca restrykcyjne, prowadząc do błędnej interpretacji [87], w niemal wszystkich dotychczasowych badaniach technika okazała się skuteczna [20, 21, 88].

phylogenies only derive evolutionary relationships for the particular gene used that might not display the true species phylogeny owing to incomplete lineage sorting or horizontal gene transfer at the locus in question [3]. Blow fly phylogenies based on nuclear and mitochondrial genes have revealed conflicting evolutionary relationships. Hence, a switch to multi-gene approaches to screen multiple independent sites across forensically important insect genomes is needed. The combinations of such genes are supposed to react positively and maximize the explanatory power of sequences to resolve phylogenetic relationships [79–81]. It has been stated that the combined analysis of mtDNA fragments is a more accurate approach for *Diptera* species identification than single COI fragment analysis [82]. Few studies have used multi-gene phylogenies to determine the identity of forensically important flies [71, 83]. Both COI and COII are the most studied combination which offer relatively rapidly evolving complementary marker suitable for investigating recently diverged species [16, 20, 39, 83–86]. Zaidi and his colleagues reported that the inter-specific variation for mtDNA segments, comprising CYTB, COI and ND5 was found suitable for phylogenetic analyses of blow fly species [70]. The effectiveness of ITS2 was reported as a complement to COI in case of ambiguous specimen identification [76]. The discrepancy in the phylogenetic trees based on individual genes (COI or ND5) improved after combination of both gene fragments [79, 81]. On the other hand, the combinations of gene fragments were not succeeded in other experiment. For example, in case of COI, COII and ND4 unambiguously identified a large portion of the specimens included [81].

RFLP analysis of molecular marker (PCR-RFLP)

Unique banding patterns, which are produced from the restriction digestion for each closely related species, can be used for species identification. It is commonly used as cheap and fast alternatives to sequence-based species identification. Although the announced fear that intraspecific variation may affect RFLP approaches; point mutations may alter restriction sites and thus lead to misidentifications if not properly interpreted [87]. Almost in all previous

Polimorfizm długości amplifikowanych fragmentów

Metoda wykorzystująca profile polimorfizmu długości amplifikowanych fragmentów (AFLP) jest prosta i niezbyt kosztowna. Pozwala na lepszą identyfikację istniejących powiązań filogenetycznych w blisko spokrewnionych taksonach niż przy zastosowaniu barcodów. We wcześniejszych doniesieniach wskazywano na brak możliwości różnicowania gatunków *L. caesar* i *L. illustris* na podstawie analizy genu COI [89], w jednej z najnowszych prac wykazano jednak, że oba gatunki są wzajemnie monofiletyczne pod względem genotypów AFLP, co pozwala na ich wiarygodną identyfikację [90].

Mikromacierze

Mimo że metoda nie była dotąd szczegółowo badana, przewiduje się, że w przyszłości będzie odgrywać istotną rolę w naukach sądowych [91]. Dzięki pojedynczej płytce mikromacierzowej możliwe będzie niemal dowolne genotypowanie poszczególnych gatunków owadów [92].

Metoda Western blot i marker białkowy

Inne markery przydatne do identyfikacji gatunkowej to allozymy. Wallman i Adams opisali pomyslnie zróżnicowanie czterech gatunków *Calliphora* spp. (dorosłych owadów oraz osobników w trzeciej fazie larwalnej) za ich pomocą [93]. McDonagh i wsp. wykazali potencjalną moc dyskryminacyjną techniki Western blot u czterech gatunków muchówek z rodziny plujkowatych. Ich zdaniem dzięki takim swoistym gatunkowo markerom możliwe będzie opracowanie zestawów diagnostycznych do szybkiej analizy najbardziej rozpowszechnionych plujkowatych [3].

Polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (SNP)

Metoda łączy technikę PCR w czasie rzeczywistym z analizą profilu topnienia w wysokiej rozdzielczości [94]. Potwierdzono, że umożliwia ona analizę zmienności genetycznej SNP oraz genotypowanie. Udało się prawidłowo rozróżnić kilka gatunków owadów na podstawie kształtu profilu topnienia oraz temperatury produktów PCR w analizie genów

studies – investigated PCR-RFLP technique in identification of forensically important species – proved to be successful and robust [20, 21, 88].

Amplified fragment length polymorphism

Amplified fragment length polymorphism (AFLP) profiles represent an easy and inexpensive method. These data are more likely than barcodes to recover the true phylogeny for closely related taxa. Previously, it was reported that *L. caesar* and *L. illustris* could not be separated using COI [89], but very recent work revealed that both species were reciprocally monophyletic for AFLP genotypes and could be reliably identified [90].

Microarrays

Although this method is not investigated extensively, but it was suggested that microarrays will have impact in forensic science [91]. Via these species-diagnostic assays, single microarray chip can be produced having the ability of performing nearly every genotyping task needed for an insect specimen [92].

Western blot and protein marker

Allozymes are another marker that can be used in species identification. Wallman and Adams have reported a clear distinction between four *Calliphora* species at both adults and third larval instar stages using such enzymes [93]. McDonagh and his colleagues had exposed the potential species discriminatory power of analytic technique as Western blot in four blow fly species, anticipating that such species-specific diagnostic protein markers might develop on-site rapid diagnostic kits for many common blow flies [3].

Single nucleotide polymorphisms (SNPs)

New method was applied for carrion-breeding blow flies identification through combining the real-time PCR and high-resolution melting assay [94]. This high-performance sensitive method proved to enable the analysis of genetic variation of SNPs and genotyping. Several insects' species

18S i COI za pomocą uniwersalnego, swoistego dla tego rzędu startera [95].

Cytometria przepływowa

Umożliwia identyfikację gatunku i płci, a tym samym różnicowanie blisko ze sobą spokrewnionych gatunków w przypadku skomplikowanych cech morfologicznych lub ich braku. U niektórych gatunków pozwala na skuteczne różnicowanie wielkości genomów [96].

Identyfikacja chemiczna („chemiczny odcisk palca”)

Profil chemiczny (m.in. skład i stężenie) włók zmienia się w toku procesu rozkładu. Dzieje się tak ze względu na substancje wytwarzane przez bakterie, które trawią białka, lipidy i węglowodany. Związki te działają następnie jako wskaźniki olfaktoryczne (semiochemiczne lub lotne) przy kolonizacji włók przez stawonogi [2]. Według jednej z hipotez obecność bakterii na lub w włókach sprzyja przepoczwarzaniu i rozwojowi larw, ponieważ bakterie mogą zwiększać dostępność substancji odżywczych lub same stanowić źródło pożywienia [97]. W celu identyfikacji ogromnej liczby bakterii występujących w miejscach rozkładu szczątków wykorzystuje się metagenomową analizę losowych fragmentów tzw. metodą „shotgun” albo analizę 16S rDNA lub 16S rRNA metodą pirosekwencjonowania FLX kodowanych znacznikami ampikonów bakteryjnych za pomocą sekwencjonowania kolejnej generacji [97, 98]. Badania nad transkryptomem i skupiskami bakterii jelitowych wykazały różnicę w częstości ich występowania w zależności od regionu jelita owadów. Odzwierciedlają one różnice metaboliczne między poszczególnymi regionami – jelito przednie i środkowe odpowiada na ogół za procesy sygnalizacji i fermentacji, natomiast jelito tylne uczestniczy głównie w transporcie składników odżywczych oraz usuwaniu produktów odpadowych przemiany materii [98]. Najnowsze dane wskazują na współpracę metaboliczną pomiędzy gospodarzem a jego mikrobiotą pod względem przyciągania muchówek oraz wpływu na proces owipozycji [99–101], a także trawienia, detoksykacji i obrony, która może obejmować nie tylko jelito owadów nekrofagicznych, lecz także zasoby odżywcze [98].

were successfully differentiated by the melt profile shape and temperature of their 18S and COI PCR product using order-specific universal primer [95].

Flow cytometry

Flow cytometry is a useful tool to forensic entomologists for species and sex identification to distinguishing between closely related species either due to difficult or non-existent morphological characters, the genomes size for some species are well differentiated based on flow cytometry [96].

Chemical identification (fingerprinting)

It is demonstrated that the chemical profile (including composition and concentration) of dead body changes during the decomposition process. This happens due to the produced substances by bacteria which digest proteins, lipids and carbohydrates that act as olfactory clues (semiochemicals or volatiles) for arthropod colonization [2]. It has been proposed that the presence of bacteria on or in the corpse appears to aid in larval pupariation and development as it could be either used as making nutrients more available to larvae or being themselves as a food source [97]. Metagenomic shotgun “random” analysis or bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing analysis of 16S rDNA or 16S rRNA using the next-generation sequencing are often used to identify the huge number of bacteria that normally present at sites of decomposition [97, 98]. Studying the gut transcriptome and gut microbial community has revealed a difference in bacterial prevalence between insect’s gut regions. Indeed, this reflects the significant metabolic differences between the regions, as the foregut and midgut are usually involved in signalling and digestion, while the hindgut mainly involved in the transport of nutrients and waste removal and detoxification [98]. Recent data has provided an evidence of metabolic cooperation between the host and its microbiota for attraction and oviposition of flies [99–101], as well as for digestion, detoxification and defence that can extend from the necrophagous insects’ gut to its nutritional resource [98].

In addition, the attractive role of some volatiles released by dead bodies could have potential im-

Ponadto określenie roli niektórych substancji lotnych uwalnianych przez zwłoki w wabieniu owadów może mieć znaczenie przy ustaleniach, dlatego szczątki ludzkie przyciągają określone gatunki [101]. Na ich podstawie możliwe jest też szacowanie PMI, dlatego niezbędne są interdyscyplinarne badania służące identyfikacji substancji lotnych oraz czynników sprzyjających aktywacji owadów. Wiedza ta będzie mieć bezpośrednie przełożenie na ustalenie PMI_{min} . Przewiduje się, że w niedalekiej przyszłości metody mikrobiologiczne i biochemiczne umożliwią takie analizy, a badania zachowania stawonogów z perspektywy genetycznej przyczynią się do zmniejszenia odsetka błędów w ES [2].

Badacze zwracają także uwagę na metody spektroskopii wibracyjnej, m.in. spektroskopię bliskiej podczerwieni, spektroskopię osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni i spektroskopię w podczerwieni z transformacją Fouriera, jako szybkie, nieniszczące i ekonomiczne techniki analizy, które wymagają minimalnego przygotowania próbek. Można je wykorzystać do identyfikacji metabolicznej (białek, lipidów, procesów komórkowych) owadów, co z kolei ułatwia różnicowanie międzygatunkowe, ponieważ oskórek przedstawicieli poszczególnych gatunków ma unikatowy skład chemiczny związany ze spektrum absorpcji [102]. Metody te mogą być równie swoiste jak barcoding, a przy tym eliminują konieczność stosowania kosztownych i czasochłonnych technik na bazie DNA [103]. W niedawnym badaniu okazały się one przydatne przy identyfikacji gatunków należących do rodziny *Sarcophagidae* [104].

Pomiar czasu od owipozycji oraz szybkości rozwoju

Metody morfologiczne

Wartość PMI_{min} jest określana na podstawie wieku najstarszego owada w stadium preimaginalnym zabezpieczonego na zwłokach [11]. Największa dokładność szacowania wieku muchówek jest osiągana we wczesnych stadiach rozwojowych (tj. od jaj po larwy w drugim stadium). Znacznie dłuższy czas trwania trzeciego stadium larwalnego i stadium poczwarki utrudnia szacowanie wieku [105]. Najnowsze badania dostarczają systematycznych danych rozwojowych na temat gatunków muchówek (uzyskanych na podstawie dysekcji poczwarek pod

plications in the better understanding of attractiveness of certain species toward a corpse [101]. PMI could be estimate based on identification of these volatiles that associated with a dead body. Thus, collaborative research is required to identify more volatiles and factors affecting insect activation. This will has direct impact on estimation of the negligible duration between death and initial arthropod detection of dead body. It will be measurable in near future through different assays (microbial and biochemical). Moreover, it has been suggested that understanding the behaviour of arthropods based on genetics will help decrease error in FE [2].

Recently, it is claimed that vibrational spectroscopies such as near infra-red (NIR), attenuated total reflection (ATR) and Fourier-transform infrared (FTIR) are rapid, non-destructive and cost effective techniques which require minimal sample preparation. They can be used to determine the metabolic identity (proteins, lipids, cellular processes) of the insect which in turn help in differentiation between species because the cuticle of each species may have a unique chemical composition because of their particular absorption spectrums [102]. Thus, it can be as specific as barcoding, without the need for expensive and time-consuming DNA techniques [103]. Recent study revealed that the use of NIRS, ATR, FTIR helped in identification of insect species belong to *Sarcophagidae* [104].

Using time since oviposition and developmental rate

Morphological methods

A PMI_{min} is estimated by calculating the age of the oldest immature insect on a corpse [11]. Fly age estimation with high accuracy is usualy in early stages (egg through second instar). On the contrary, the far longer duration of the third instar and pupal stages makes estimation of age more difficult with high percentage of error [105]. Thus, recent studies provide successfully systematic pupal developmental data of forensically important fly species (based on pupal dissection under stereomicroscope) for the estimation of PMI with recommendation to take

mikroskopem stereoskopowym), które mogą być pomocne przy określaniu PMI, zalecając uwzględnienie w analizie czynników zakłócających (np. temperatury otoczenia), aby uniknąć błędów [106, 107]. Inni badacze oceniali progresję wieku, analizując diapauzę w trzecim stadium larwalnym. Etap ten stanowi ok. połowy całkowitego okresu rozwoju młodych osobników i może trwać kilka tygodni, a nawet miesięcy. Dowiedziano potencjalnej przydatności analizy ekspresji genów jako narzędzia diagnostycznego w badaniach diapauzy u gatunków, u których występuje brak spójności poziomów ekspresji (*C. vicina* i *L. sericata*). Ta niespójność może wynikać z różnicy w procesach bazowych i potwierdza hipotezę kilku dróg ewolucji diapauzy [108].

Dzięki coraz liczniejszym dowodom potwierdzającym różnicowanie biogeograficzne gatunków rośnie znaczenie gromadzenia danych rozwojowych pozyskiwanych lokalnie [2]. Przykładowo, w populacjach angielskich *L. sericata* stwierdza się niższą śmiertelność oraz mniejsze rozmiary dorosłych osobników niż w populacjach hiszpańskich [109]. Dlatego dobrą praktyką jest przyporządkowanie muchówek do odpowiedniej populacji przed przystąpieniem do szacowania wieku na podstawie cech rozwojowych. Taka procedura może zmniejszyć odsetek błędów przy określaniu PMI [2].

Wraz z postępem w technikach obrazowania nowe metody osiągają znacznie wyższą moc dyskryminacyjną niż mikroskopia świetlna. Badanie larw za pomocą mikroskopu SEM zapewnia wyższą rozdzielczość, wiąże się jednak z trudnościami technicznymi [110]. Flores i wsp. za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej zdefiniowali zestaw mierzalnych kryteriów morfometrycznych i opisali przechodzenie od drugiego do trzeciego stadium larwalnego. Najważniejsze wyzwania tej metody to: 1) wpływ zależnej od uwarunkowań genetycznych lub środowiskowych zmienności larw na mierzalne różnice między próbkami oraz 2) trudności wdrożeniowe ze względu na koszty i specjalistyczną wiedzę niezbędną w mikroskopii fluorescencyjnej [111].

Od niedawna stosuje się też mikrotomografię komputerową, która pozwala na wykrywanie wewnętrznych i zewnętrznych zmian morfologicznych gatunku *C. vicina* w celu dokładnego szacowania wieku osobników w stadiach preimaginalnych [112]. „Dysekcja wirtualna” ma przewagę nad metodą klasyczną; może być również wykonywana

in consideration confounding factors (such as environmental temperature) to avoid any error [106, 107]. Other researchers thought to overcome the problem of aging during diapausing in the third larval stage. This stage lasts about half the total juvenile development and may extend up to several weeks or even months. Previous study proves the potential use of gene expression analysis as a suitable diagnosis tool for diapause in a blow fly species with inconsistency of expression levels in different species (*C. vicina* and *L. sericata*). This inconsistency could be due to the difference in underlying processes and supports the hypothesis of multiple evolutions of diapauses [108].

Increasing evidence of biogeographic variation in forensically important species makes use of locally derived development data critical for accurate assessment [2]. For example, *L. sericata* derived from English populations tend to suffer lower mortalities and produce smaller adults than Spanish populations [109]. Thus, it is best practice to assign flies to their proper population before estimation of their ages with developmental data. This practice should result in lower error rates for PMI estimates [2].

With the advancement in imaging techniques, new methods improved discriminatory power of the lower resolution of light microscopy. Inspection of the larvae was done by using SEM provides greater resolution but it is technically challenging [110]. Flores *et al.* defined successfully a set of measurable morphometric criteria and captured developmental transitions of second instar to third instar using fluorescence microscopy (FM). The major challenges are 1) either genetically or environmentally driven variability in larvae will affect the measurable differences between samples and 2) the difficulty in implementation lies in cost and expertise associated with the use of FM [111].

Recently, other modalities such as micro-computed tomography are used to detect the internal and external morphological changes in *C. vicina* to estimate accurately age of immature stage [112]. The virtual dissection can help in “dissection” in several ways at once which is not possible when using the classical method. Several experts can also examine the

jednocześnie przez kilku badaczy, którzy mają nieograniczony dostęp do tych samych danych pierwotnych. Główne wady to konieczność barwienia, aby zmaksymalizować kontrast, brak różnicowania między poszczególnymi typami tkanek, niewystarczającą rozdzielczość na poziomie komórkowym oraz wysoki koszt. W przyszłości rozwój technologiczny być może wyeliminuje jednak konieczność stosowania barwników [112].

Metody chemiczne

Aminokwasy

Identyfikacja jaj jest szczególnie skomplikowana, ponieważ u wielu gatunków są one do siebie bardzo podobne pod względem morfologicznym. Identyfikację gatunkową jaj muchówek można przeprowadzić na podstawie tzw. chemicznego odcisku palca przy użyciu techniki wysokorozdzielczej spektrometrii mas w analizie bezpośredniej w czasie rzeczywistym (DART-HRMS). Podstawą chemiczną różnicowania są odmienne profile aminokwasów. Szybkość metody pozwala na generowanie bazy danych profili chemicznych jaj, na podstawie której możliwa jest analiza widm DART-HRMS jaj pochodzących od osobników nieznanymi gatunków w celu identyfikacji bez konieczności hodowania jaj aż do wieku dorosłego [113].

Ekdysteroidy

Ekdysteroidy to hormony steroidowe wytwarzane przez owady. Odpowiadają za koordynację wielu procesów rozwojowych i fizjologicznych poprzez wiązanie ze swoistym receptorem komórkowym – receptorem ekdysteroidowym [114]. Przy określaniu PMI zwracano uwagę na ograniczenia analizy ilościowej ekdysteroidów metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej/testu immunoenzymatycznego. Zdarzały się nieprawidłowe oznaczenia zawartości ekdysteroidów u martwych poczwerek, co przekładało się na błędne określenie wieku [115]. W ostatnim czasie pojawiła się propozycja stosowania metody biochemicznej (analizy Western blot receptora przeciwno ekdyzonowi) jako uzupełnienia oceny wieku larw, wymaga ona jednak dalszych badań [111].

same virtual dissection simultaneously, allowing them to freely examine the same original data. The major disadvantages are the need for staining to maximize the contrast, lack of differentiation between different tissue types, insufficient resolution power at the cellular level, and the cost. However, emerging technology in the future could eradicate the need for dyes [112].

Chemical methods

Amino acids

Determination of the egg's identity is particularly challenging, because the eggs of multiple species are morphologically very similar. The species identity of fly eggs can be determined from their chemical fingerprint signatures acquired by direct analysis in real-time high-resolution mass spectrometry (DART-HRMS). The chemical basis of discrimination was differences in amino acid profiles. The rapidity of the method makes feasible the generation of a fly egg chemical profile database against which the DART-HRMS spectra of unknown eggs can be screened to rapidly assess species identity without needing to rear the eggs to adulthood [113].

Ecdysteroids

Ecdysteroids are the steroid hormones of insects which responsible for coordination of a wide variety of developmental and physiological processes by binding to a specific cellular receptor called the ecdysteroid receptor (Ecr) [114]. The limitation of ecdysteroids quantification-based on using HPLC/EIA (high-pressure liquid chromatography/enzyme immunoassay) was reported at PMI estimation. In case of died pupae, false determination of ecdysteroids content was detected and that would falsely determine the age [115]. Recently, it is supposed that the biochemical method (anti-ecdysone receptor Western blot analysis) could be used as a complementary method for larval age determination but the extension of this investigation is needed to be able to reach final conclusion [111].

Węglowodory kutykularne

Oskórek (kutykula) owadów pokryty jest warstwą wosków zawierających węglowodory. Węglowodory kutykularne (WK) są bardzo stabilne i obecne we wszystkich stadiach rozwoju owadów [116]. Zachodzące w nich zmiany bada się na różnych gatunkach muchówek z rodziny *Calliphoridae* za pomocą chromatografii gazowej połączonej ze spektrometrią mas (GC-MS). Według dostępnych doniesień identyfikacja PMI jest możliwa w różnych stadiach rozwojowych (larwy, larwy późnego trzeciego stadium, poczwarki) u *Calliphoridae* [117, 118]. Cechy te wykazały różnice międzypłciowe u przedstawicieli gatunku *C. vicina*, natomiast nie udało się to u *L. sericata* [119]. Szybkość rozkładu WK u poczwerek wykazywała regularność oraz istotną zależność z klasą WK. Wysoka przewidywalność potwierdzona w terenie wskazuje na silne oddziaływanie warunków środowiskowych, które mogą przyspieszać tempo rozkładu [120]. Puste puparia mają wartość informacyjną zwłaszcza przy dłuższych okresach PMI, natomiast osobniki dorosłe umożliwiają pomiar PMI w ciągu pierwszych dni od zgonu [119]. Zauważono, że profil swoistych WK zmienia się wraz z wiekiem owada, a dorosłe osobniki poszczególnych gatunków mają swój własny unikatowy profil [118, 119]. Zamiast pełnej analizy wszystkich WK korzystniejsze wydaje się badanie wyłącznie nóg owadów uzupełnione o pomiar jednego określonego WK (n-pentakozanu). Technika ma tę zaletę, że nie wymaga niszczenia całości materiału dowodowego [119].

Pterydyny

Prowadzono liczne badania na muchówkach w preimaginalnych stadiach rozwoju, dużo rzadziej analizowano natomiast osobniki dorosłe, zwłaszcza w kontekście ich potencjału informacyjnego przy oględzinach miejsca zgonu [121]. Istnieje wiele metod określania wieku dorosłych muchówek, ale niewiele z nich znajduje zastosowanie w medycynie sądowej ze względu na niską precyzję, np. metody wykorzystujące obecność charakterystycznych pasm na oskórku oraz fizjologiczne cechy reprodukcyjne u samic. Obie te techniki wymagają żmudnej dyssekcji. W pierwszej wykazano skuteczność jedynie w odniesieniu do muchówek w wieku ≤ 15 dni i w przedziale temperatur 15–21°C, druga zaś umożliwia

Cuticular hydrocarbons

The cuticle of every insect is covered with an epicuticular layer of wax which contains hydrocarbons. Cuticular hydrocarbons (HC) are very stable and present in all developmental stages of insects [116]. The changes in HC are investigated in different species belonging to *Calliphoridae* by using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). It is reported that PMI can be identified among and within the different stages (larvae, post feeding larvae, pupae) belong to *Calliphoridae* [117, 118]. These traits showed difference between sexes in *C. vicina* while that is not happened with *L. sericata* [119]. The weathering rate of the puparial HCs was regular and significantly correlated with the HCs classes. It is highly predictable in the field, suggesting a strong influence of environmental conditions, which can accelerate this rate [120]. The empty puparia are of value especially for longer PMI, while adult flies enable timing for the first days post-mortem [119]. It was noticed that the profile of specific HCs changes in a consistent pattern as adult insect age with unique profiles of each adult blow fly species [118, 119]. The analysis of just the insect legs with analysis of only one specific HC (HC n-pentacosane) might be a more promising approach for age estimations than the complete analysis of all HCs without complete consumption of evidence [119].

Pteridines

Regarding the age-grading techniques, many studies were performed on the pre-adult stages of the flies, while few studies were performed on the adult flies especially because their potential in indoor death-scene investigation [121]. There are numerous methods used for aging adult flies, but few have forensic application with low precision such as cuticular bands and female reproductive physiology. However, both techniques require tedious dissection. While the first one worked only for ≤ 15 days old flies with temperature fluctuation around 15–21°C. The other technique based on female reproductive physiology could predict age up to 3 days post-mortem with no methods for aging male flies. However, use of such techniques is

szacowanie wieku do 3 dni po zgonie, ale nie sprawdza się przy ocenie wieku samców. Ich stosowanie jest więc problematyczne, ponieważ u wielu muchówek samce pojawiają się przed samicami lub składane są partie jaj jednopłciowych, co w przypadkach zgonów w pomieszczeniach zamkniętych skutkuje zabezpieczeniem wyłącznie osobników płci męskiej [122].

Pterydyny są produktami metabolizmu zasad purynowych, które odkładają się w miarę upływu czasu w występujących u owadów oczach złożonych. Mail i wsp. opracowali metodę określania wieku dorosłych muchówek z gatunku *Stomoxys calcitrans* (rząd *Diptera*: rodzina *Muscidae*) poprzez pomiar stężenia pterydyn, którą można wykorzystać także u wielu innych gatunków [123]. Ustalenie, że większość osobników jest w zbliżonym wieku, dowodzi, że rozwinęły się na szczątkach. Z kolei identyfikacja różnych grup wiekowych wskazuje, że zostały one zwabione na miejsce przez rozkładające się szczątki.

Innym obiecującym narzędziem jest analiza stabilnych izotopów u dorosłych muchówek oraz w ich pustych pupariach umożliwiająca różnicowanie źródła pokarmu larwalnego (pochodzenia ludzkiego lub zwierzęcego). Aby zwiększyć precyzję oceny, należy analizować proporcje poszczególnych pterydyn u muchówek w różnym wieku. Niezbędne są też badania na populacjach pochodzących z różnych regionów, aby określić zakres wiarygodności metody i jej przydatność do celów dowodowych [122].

Metoda molekularna

Oznaczanie ilościowe genów

Genetyka ilościowa pomaga w zrozumieniu i opisie zmienności fenotypów [2]. Geny, których ekspresja jest regulowana w górę lub w dół w zależności od stadium rozwoju owadów, są potencjalnie wiarygodnymi markerami w ocenie procesu starzenia. Przydatność badań ekspresji genów metodą PCR w czasie rzeczywistym została potwierdzona dla różnych etapów rozwojowych [124, 125], należy jednak pamiętać, że dane dotyczące muchówek zabezpieczonych w tym samym czasie mogą dawać błędne wyniki ze względu na wysoki stopień inbrodu i niewielką zmienność genetyczną. Trzeba także wziąć pod uwagę, że fenotypy mogą być kształtowane przez interakcje genetyczno-środowiskowe. Na rozwój może też wpływać wilgotność pokarmu czy zagęszczenie larw. Badania pozwolą na ograniczenie

problematic as many blow fly may emerge males prior to females or may lay single-sex egg batches, making it possible for only male flies to be collected at an indoor death [122].

The pteridines are degradation products of purine metabolism and accumulate over time in compound eyes. Mail *et al.* developed a method to determine the age of adult *Stomoxys calcitrans* (*Diptera*: *Muscidae*) by measuring the level of pteridines with applicability to many other insect species [123]. Quantifying pteridines in the heads of *C. megacephala*, *C. macellaria*, and *P. regina* is an effective method for estimating the age of adult flies. If the majority of flies are of a similar age group (based on pteridines fluorescence), this could support the hypothesis that these flies were produced from the remains. But if flies were just attracted to the remains, it would likely not fall into this same age group.

Stable isotope analysis shows promise as an additional tool for distinguishing the larval food source (human or animal origin) of adult blow flies and their empty puparia. The ratios of the different pteridines should be investigated at different flies' age to increase the precision of aging flies. It also should be tested on regional fly populations to determine the range of validity and application to forensic casework [122].

Molecular method

Gene quantitation

Quantitative genetics helps to understand and recognise variation in continuously variable phenotypes [2]. In this regard, the different genes that are up- or down-regulated during different life stages are potentially reliable markers to assess the ageing process. Thus, study of gene expression based on real-time PCR has already been demonstrated in different developmental stages [124, 125]. With consideration that developmental data collected from flies caught at the same time may result in genotype-biased results due to large degree of inbreeding. This could be solved by large population sizes which will maintain genetic variation. Another important consideration is that phenotypes can be affected by genetic–environmental interactions. Howev-

nie błędów w ocenach opartych na dowodach entomologicznych poprzez ustalenie, w jaki sposób dochodzi do odchyżeń. Entomolodzy sądowi będą mogli wówczas uwzględnić te czynniki w swoich analizach [2].

Metody genomiki funkcjonalnej nie należą do rutynowych praktyk w medycynie sądowej. Genomika funkcjonalna jest przydatna przy określaniu zależności między konkretnymi regionami genowymi a różnicami fenotypowymi. Takie zróżnicowanie u gatunków muchówek żerujących na zwłokach ma kluczowe znaczenie w praktyce procesowej. Za pomocą metody PCR w czasie rzeczywistym monitorowano np. poziomy ekspresji molekularnej genów rytmu okołodobowego, aby określić ewentualną zależność między ekspresją genu a zachowaniem. Jest to istotne przy szacowaniu PMI_{min}, jeśli zgon nastąpił w nocy. Badania wykazały regulację ekspresji genów i zachowania w celu adaptacji do zmienionego oświetlenia. Wyniki te przeczą ogólnie przyjętemu założeniu, że u *C. vicina* owipozycja zawsze następuje za dnia [126].

Analizy umożliwią również ocenę wieku muchówek [105]. Nowa technika oparta na transkryptomie *de novo* i cyfrowej metodzie ekspresji genów pozwoliła uzyskać profile ekspresji genowej o wysokiej rozdzielczości, które identyfikują markery genetyczne jako kandydatów do szacowania wieku *C. vicina pupae*. Badacze wysunęli wniosek, że metody NGS umożliwiają ocenę ekspresji genów w wysokiej rozdzielczości oraz ujawniają zróżnicowaną ekspresję transkryptów o niskiej liczebności poza zakresem mikromacierzy i sekwencji RNA-seq w przypadku sekwencjonowania o zbliżonej głębokości [127].

Opracowanie szybkiej i niezawodnej metody szacowania wieku poczwerek muchówek z rodziny plujkowatych nadal stanowi wyzwanie. Poczwarki odpowiadają za ok. 50% owadów w postaci preimaginalnej ujawnianych na zwłokach. Zidentyfikowano nowe markery, które wykazują swoisty, zależny od wieku przebieg ekspresji w fazie rozwoju poczwerek u *C. vicina* na podstawie danych transkryptomowych otrzymanych metodą masowego równoległego sekwencjonowania. Następnie opracowano i poddano walidacji oznaczenie prowadzone metodą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy (qPCR) w każdej z 15 wyznaczonych grup wiekowych poczwerek w 4 różnych temperaturach. W większości badanych markerów nie stwierdzono zależności od temperatury. Do określania fazy rozwojowej zalecono wykorzystywanie profilu ekspresji genowej dla jednego

er, other factors such as food moisture and larval density can also influence fly development. Continuous research will enable the discipline to reduce error in estimates with entomological evidence by understanding how deviations may occur and consequently allow forensic entomologists to account for these factors in analyses [2].

Unfortunately, analyses related to functional genomics have not been routine practice in FE. Functional genomics helps to find relation between certain genetic region and phenotypic differences in fly. Such variations in forensically informative fly species are critical from forensic point of view. For example, the molecular expression levels of circadian genes were monitored based on real-time PCR to determine whether gene expression and behaviour correlated. This is important in cases of night death to calculate a PMI_{min}. The results declared the adjustment in gene expression and behaviour to adapt with the shifted regime of light. This is reverse the traditional assumption that oviposition by this species (*C. vicina*) always occurs during daylight [126].

The functional genomics researches will also enable to predict fly age [105]. In this direction, recent analysis based on *de novo* transcriptome and digital gene-expression method provided high-resolution gene expression profiles which identify genetic markers as candidates for age estimation of *C. vicina pupae*. This study drew a very promising conclusion that NGS provides high-resolution gene-expression values and reveals differential expression of low-abundant transcripts beyond the scope of microarrays and RNA-seq, if sequenced at similar depth [127].

Establishing a quick and reliable method for the age estimation of blow fly pupae is therefore still a challenge of current research and particularly important because this stage occupies about 50% of the immature development. Thus, new age markers were identified, which show a very specific age dependent expression course during pupal development of the forensically-important blow fly (*C. vicina*) by massive parallel sequencing (MPS) generated transcriptome data. Then, quantitative PCR (qPCR) assays were designed and validated for each of 15 defined pupal ages at 4 different temperatures. A temperature dependency could not be observed for most of test-

lub dwóch markerów. Docelowe stosowanie molekularnych markerów wieku w ES wymaga dalszych badań w niskich temperaturach, w których okres przeobrażenia może być dłuższy. Ponadto należy opracować modele matematyczne do oceny wariancji, aby umożliwić cyfrowe określanie wieku [128].

W ostatnim czasie zaproponowano też prostą i szybką metodę molekularną umożliwiającą identyfikację gatunkową larw muchówek ujawnionych na miejscu przestępstwa. Badanie obejmuje amplifikację PCR krótkiego segmentu DNA zawierającego część eksonu-4 i eksonu-5 genu *wingless* (biorącego udział w rozwoju zarodkowym) i występującego między nimi intronu. W ten sposób wyodrębniono segment genomowy o stałej wielkości wewnątrzgatunkowej, ale różnej wielkości pomiędzy gatunkami. Uważa się, że metoda ta ma przewagę nad technikami molekularnymi, które są czasochłonne, drogie i wymagają zaawansowanego sprzętu. Każdy zabezpieczony osobnik może być identyfikowany na podstawie wielkości amplifikowanego segmentu. Zalecono rozszerzenie prowadzonych badań o identyfikację genów o zróżnicowanej ekspresji podczas rozwoju zarodkowego w celu identyfikacji wieku larw zabezpieczanych osobników [129].

Określanie miejsca zgonu i ujawnienia ciała

Określanie miejsca zgonu

Innym zadaniem ES jest określanie miejsca zgonu. Owady żerujące na zwłokach mogą potwierdzić miejsce zgonu, jeśli występuje tam populacja tego gatunku, lub ujawnić przeniesienie zwłok do innej lokalizacji, jeżeli dany gatunek tam nie występuje [130]. Pochodzenie geograficzne dowolnej próbki można określić za pomocą metod przyporządkowania do populacji. Metody te opierają się głównie na różnicach w hiperzmiennych obszarach nDNA [131]. Do najczęściej wykorzystywanych markerów hiperzmiennych należą: losowo amplifikowane polimorficzne DNA (RAPD) [132–134], polimorfizmy długości amplifikowanych fragmentów (AFLP) [135, 136] oraz sekwencje mikrosatelitarne (STR) [35]. Z kolei polimorfizmy konformacji fragmentów jednoniciowych (SSCP) stanowią niedrogą i wygodną metodę badania zmienności genów mt (przy wykorzystaniu wielu *loci* mt) w dużych próbkach z za-

ed markers. The gene expression profile of one to two markers was recommended to define the progress in development. For application of molecular age markers in FE, further work is recommended at low temperatures that where the metamorphosis may last longer. Furthermore, mathematical models have to be developed to estimate the variance of age determination, to be able to detect the digital age [128].

Recently, it was suggested an alternative simple and rapid molecular method to identify the species of the fly larvae found at a crime scene. This involves the PCR amplification of a short DNA segment containing part of exon-4 and exon-5 of the *wingless* gene (involved in embryo development) and the intron between them. It identified a genomic segment with a constant intraspecific size but a different size among species. It is claimed that it is better than the current molecular methods that require time, money and sophisticated instrumentation. Each specimen can be identified based on the amplified segment size. It was recommended to extend such work to identify genes that differentially expressed during embryo development to identify the larval age of the found specimens [129].

Determination of death and body location

Determination of death location

Another application of FE is to determine place of death. The presence of a definite species on the suspect proves death location where population of this species is present. Then, the transfer of dead body to another place in which this species is not found [130]. Geographic origins of any sample can be determined using population assignment methods. These methods are based mainly on differences in hypervariable nDNA [131]. The hypervariable markers most often used are Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) [132–134], Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) [135, 136] and microsatellite (STRs) [35]. Moreover, single strand conformation polymorphisms (SSCPs) provide an inexpensive and convenient method of surveying mitochondrial genetic variation (by using multi-

stosowaniem systemu oceny do analizy zmienności międzypopulacyjnej, np. różnic wykrytych między populacjami *Musca domestica* w Afryce i Ameryce Północnej [137].

Losowa amplifikacja polimorficznego DNA (RAPD)

Do generowania widm polimorficznych wykorzystuje się nieswoiste startery RAPD [11]. Wykazano, że profile RAPD ujawniają obecność polimorfizmów w regionach niekodujących genomu [138]. Stevens i Wall udowodnili, że blisko spokrewnione ze sobą populacje *L. sericata* można rozróżnić na podstawie profili RAPD, nawet jeśli na zwłokach ujawniono więcej niż jedną populację [134].

Polimorfizm długości amplifikowanych fragmentów (AFLP)

Zazwyczaj amplifikacji i detekcji podawanych jest 50–100 fragmentów restrykcyjnych, metoda AFLP stanowi więc potężne narzędzie genotypowania. Analizom poddaje się m.in. istotne z punktu widzenia medycyny sądowej muchówki z rodzin plujkowatych i ścierwicowatych [135, 136, 139, 140]. Za główną zaletę AFLP uznaje się wysoką zdolność dyskryminacyjną, ponieważ przy identyfikacji dodatkowych markerów można wykorzystywać wiele kombinacji selektywnych nukleotydów pod kątem opracowywania swoistych gatunkowo profili [140]. Za pomocą analizy opartej na AFLP potwierdzono słabą zależność między odległością geograficzną i genetyczną u *Phormia regina* i *L. sericata* przy dodatnim względnym współczynniku spokrewnienia. Wyniki te wskazują na potencjalną przydatność metody przy ocenie pośmiertnego przemieszczania zwłok [135, 136, 141].

Markery mikrosatelitarne

Sekwencje mikrosatelitarne to bardzo krótkie powtórzenia tandemowe (STR) lub proste sekwencje powtarzalne (SSR) występujące w tandemowych motywach o długości 2–6 pz [142], które u niektórych gatunków stanowią nawet 45% genomu [143]. Sekwencje mikrosatelitarne mają znaczenie jako markery na bazie DNA o pojedynczym niekodującym locus [35, 39]. Powszechnie uważa się, że te niekodujące

ple mt loci) in large samples with scoring to investigate variations between populations such as difference was detected between African and North American populations of *Musca domestica* [137].

Random amplified polymorphic DNA (RAPD)

The non-specific RAPD primers are used to generate polymorphic bands which are useful as genetic markers [11]. RAPD profiles have proven to reveal polymorphisms in non-coding regions of the genome [138]. Stevens and Wall showed that closely related populations of *L. sericata* could be distinguished on the basis of their RAPD profiles even if more than a population is found on the corpse [134].

Amplified fragment length polymorphism (AFLP)

Typically, 50–100 restriction fragments are amplified and detected, making the AFLP technique a powerful genotyping method. Recently, AFLP assays are utilized on a wide variety of taxa including the forensically important blow fly and flesh fly [135, 136, 139, 140]. The high discriminative capacity is considered as main advantage of AFLP since multiple combinations of selective nucleotides can be used to observe additional markers to develop species specific profiles [140]. Via AFLP-based analysis, negligible correlation between geographic and genetic distances was found in blowflies *Phormia regina* and *L. sericata* with positive mean relative relatedness coefficient, supporting a genetic test for inferring the post-mortem relocation of a corpse [135, 136, 141].

Microsatellites markers

Microsatellites, named for the very short tandem repeats (STRs) or simple sequence repeats (SSRs) that are repeated in tandem motifs of 2–6 bp in length [142] which might be as much as 45% of the genome in certain species [143]. Microsatellites have been widely gaining importance as single-noncoding locus DNA markers in population genetic analysis [35, 39]. These noncoding regions are generally perceived to have high mutation rate

regiony odznaczają się wysokim wskaźnikiem mutacji, co potwierdza duży stopień polimorfizmu [144] przydatny przy różnicowaniu osobników w ramach gatunku. Rozwój technik identyfikacji genetycznej przy użyciu *loci* mikrosatelitarnych, które pozwalają na przypisywanie osobników nieznanego pochodzenia do określonej lokalizacji geograficznej, może być przydatny w naukach sądowych [145]. Istnieje niewiele populacyjnych badań genetycznych prowadzonych na muchówkach istotnych w kryminalistyce, m.in. należących do gatunków *L. illustris*, *L. sericata*, *C. albiceps* i *C. putoria* [4, 146, 147]. U muchówek nekrofagicznych udało się przekształcić swoiste gatunkowo fragmenty sekwencji międzymikrosatelitarnych (ISSR) w markery w postaci tzw. sekwencyjnie charakteryzowanych regionów amplifikowanych (SCAR). W rezultacie uzyskano swoisty dla gatunku marker o potencjalnym zastosowaniu w analizie populacyjnej w różnych regionach kraju w przypadku odmiennych wzorów prążkowych [142, 143]. Takie badania pozwoliłyby na przypisywanie różnych osobników do określonych lokalizacji geograficznych oraz analizę pokrewieństwa, umożliwiając wnioskowanie o pośmiertnym przeniesieniu zwłok [4, 92, 136].

Opracowanie nowego testu wykorzystującego sekwencje mikrosatelitarne dla danego gatunku jest bardzo pracochłonne [39], przy czym u niektórych owadów zadanie to przysparza szczególnych trudności [150]. Znacznym ułatwieniem mogą być techniki NGS. W literaturze opisywano sekwencjonowanie Roche 454 w ekstrakcji danych dotyczących sekwencji mikrosatelitarnych u różnych organizmów w celu wykrywania interesujących z informacyjnego punktu widzenia *loci*, które są następnie wykorzystywane w profilowaniu populacyjnym [151]. Wykazano też, że techniki NGS odznaczają się wyższą czułością w porównaniu ze standardową analizą STR, nawet jeśli badane próbki entomologiczne zawierają minimalne ilości DNA lub materiał jest silnie zdegradowany [5, 152]. Aby zwiększyć moc dyskryminacyjną, jako cele dla technik NGS można wykorzystywać STR i SNP [153]. Ponieważ niewiele wiadomo o zachowaniu owadów z dala od padliny, podejmowane są próby opracowania systemu profilowania mikrosatelitarnego przy wykorzystaniu NGS do analizy zachowań populacyjnych przy wyższej rozdzielczości [151].

Użyteczną metodą przypisywania osobników do populacji jest też konstruowanie haplotypów za pomocą oprogramowania HaploPOP. Ocenia się,

which provides evidence of high levels of polymorphism [144] for detectable distinction between individuals within a species. Developments in genetic assignment techniques using microsatellite loci for assigning individuals of unknown origin to a certain geography can help in forensic science to identify insects specimen to their population of origin [145]. There are few population genetic studies which were performed on certain forensically informative species belong to blow flies including *L. illustris*, *L. sericata*, *C. albiceps* and *C. putoria* [4, 146, 147]. In forensically informative necrophagous fly, previous studies had succeeded to convert species-specific Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR) fragments into sequence characterized amplified region (SCAR) markers; resulting in species-specific marker that can potentially be applied for population assignment of same species from different regions in same country which yielded different banding patterns [142, 143]. Such investigation would be useful in assigning specimens to particular geographic locations and for kinship analysis by providing basic information to infer post-mortem relocation of corpses [4, 92, 136].

In 2000, it is elucidated that development of new microsatellite test for a certain species is very labor-intensive [39] and even more difficult to develop in some insects than others [150]. Now, it becomes clear that NGS will make this task easy. The process of using Roche 454 sequencing to extract microsatellite sequence data was described from various organisms to detect the loci of interest that are then used to profile populations [151]. Moreover, it is revealed that NGS techniques have higher sensitivity in comparison to standard STR analysis, even with using low template and degraded entomological samples [5, 152]. To maximize the power of discrimination, STRs and SNPs can be incorporated as targets for NGS [153]. Because of little information is known about insect behaviour away from carrion. This is why there is a trial to create a microsatellite profiling system by NGS to identify higher resolution, population-level behaviour [151].

Construction of haplotypes with HaploPOP is considered to be valuable methods to assign individuals to known populations in forensic science. Through using such approach, the accuracy of

że może ona znacznie poprawić dokładność przyporządkowywania populacyjnego (błąd przypisania można zmniejszyć nawet o 70%) [154]. W teorii ES pozwala również na analizę i walidację wcześniejszych obserwacji u ludzi, genetyka populacyjna nie należy jednak do rutynowych badań entomologicznych wykonywanych na miejscu ujawnienia zwłok.

Analiza genetyczna jest pomocna przy identyfikacji określonych populacji w obrębie gatunku, dlatego konieczne jest tworzenie baz danych dla poszczególnych populacji, co umożliwi identyfikację osobników należących do określonych grup. Populacje mogą różnić się na poziomie genetycznym bez żadnych różnic w fenotypie. Rozbieżności fenotypowe są także możliwe w obrębie tej samej populacji przy wysokim tempie przepływu genów. Badanie pełnego zakresu oczekiwanej zmienności jest bardzo istotne, ponieważ ma wpływ na przewidywania i stopień pewności przy wykorzystywaniu dowodów entomologicznych [2]. Badacze powinni uwzględnić przy tym kilka czynników, m.in. losowy dobór dużej, reprezentatywnej próbki, określenie granic populacji oraz ustalenie, czy wybrane populacje znajdują się w równowadze Hardy'ego-Weinberga [131]. Mają one duże znaczenie dla wydajnej analizy populacyjnej i uzyskiwania dokładnej skali geograficznej dla struktury genetycznej danej populacji [151].

AFLP a STR

Współdominujące markery STR mają większą zdolność rozdzielczą na *locus* przy określaniu pochodzenia populacyjnego próbek niż dominujące markery AFLP. W porównaniu z analizą STR metoda AFLP wymaga wysokiej jakości próbek DNA. Ustalono także, że błędy w analizie STR są mniej istotne niż w AFLP głównie ze względu na różnice w wysokości pików [125].

Określanie lokalizacji zwłok

Podjęmowane są próby opracowania przenośnych systemów, które umożliwiłyby wykrywanie rozkładających się szczątków na podstawie „chemicznego odcisku palca” (jak opisano powyżej), komplementarnych wobec metody lokalizowania zwłok przez psy. Identyfikacja profilu chemicznego może też pomóc w szkoleniu psów poszukujących ludzkich zwłok [155].

population assignment will be significantly improved as the assignment error can substantially reduce to 70% [154]. This previous experience with human could be tested and validated in FE. Unfortunately, analysis related to population genetics has not been routine practice in FE.

Population genetic analysis helps to identify distinct population within a species. Thus, it is mandatory to establish population-specific databases to be able to identify individuals that belong to those groups. Populations may be diverging at genetic level without diverging in phenotype. Moreover, phenotypes may be diverged in the same population if gene flow is high. Exploration of the full range of expected variation is very important, which will have great impact on predictions and confidence with using entomological evidence [2]. Researchers should take into consideration several factors that increase the accuracy of assignment tests such as collection of random large representative sample, identified the boundaries of populations, selected populations are in Hardy-Weinberg equilibrium [131]. These factors are important to perform efficient population genetic analysis and provide accurate geographic scale of population genetic structure [151].

AFLP versus STRs

STRs outperform AFLPs. The co-dominant STRs markers have more resolving power per locus to determine the population origins of sample in comparison to the dominant AFLPs markers. The AFLPs technique requires high quality DNA in comparison to STRs. The errors associated with STRs have been found to be lesser than for AFLPs mainly because of differences in peak height intensity [125].

Determination of body location

The efforts are being done to make portable detection systems which would locate decomposing bodies based on chemical fingerprinting (as described before). This could be compliment to canine lead to victim recovery. Moreover, identification of chemical profile could be used to train the canines [155].

Przyczyna zgonu

Identyfikacja obszarów urazów

Skóra stanowi skuteczną barierę dla larw żerujących na zwłokach, chroniąc tkanki miękkie przez pierwsze kilka dni procesu rozkładu. Na zwłok bez urazów muchówki z rodziny plujkowatych w pierwszej kolejności składają jaja w naturalnych otworach na twarzy (oczy, nos, usta), gdzie ujawniane są pierwsze masy złożonych jaj. Dzieje się tak na skutek wydostawania się gazów powstających podczas rozkładu ciała przez nos i usta. W przypadku ujawnienia na ciele dużych kolonii larw w takim samym lub starszym wieku niż kolonie w obrębie twarzy, można przypuszczać, że właśnie w tej lokalizacji doszło do urazu [130].

Wykrywanie substancji w tkankach owadów (entomotoksykologia)

Beyer i wsp. jako pierwsi opisali wykrywanie substancji chemicznych spożytych przez osoby przed śmiercią poprzez analizę owadów zabezpieczonych na zwłokach [156]. Metoda może być wykorzystywana w przypadkach, w których standardowe badania są utrudnione z względu na przekonania religijne lub względy etyczne. Badania toksykologiczne owadów mają niewątpliwe zalety – wykazano większą czułość analizy owadów niż materiału pobranego ze zwłok objętych procesem gnilnym. Ponadto stężenia leków wykazują większą stabilność w organizmach owadów niż w pobranych pośmiertnie próbkach tkanek ludzkich [157]. Dzieje się tak na skutek magazynowania związków chemicznych w strukturze molekularnej zewnętrznej osłony chitynowej pokrywającej ciało owadów [130], gdzie zachowują stabilność i przez dłuższy okres nie ulegają zmianom [158, 159].

Entomotoksykologia zajmuje się głównie analizą owadów pod kątem identyfikacji substancji toksycznych spożytych za życia przez ludzi, zwłaszcza w przypadkach, gdy zwłoki uległy zaawansowanemu rozkładowi lub zeszkieletowaniu. Dostarcza ona dwóch podstawowych rodzajów informacji istotnych z punktu widzenia medycyny sądowej: 1) umożliwia pozyskanie pośrednich dowodów na spożycie przez denata substancji trującej i 2) pozwala na uwzględnienie substancji toksycznych i ich ewentualnego wpływu na tempo rozwoju owadów, które ma duże znaczenie przy szacowaniu PMI. Zadaniem entomotoksykologii jest jako-

Cause of death

Identify areas of trauma

The skin is a major barrier to the early-feeding maggots with protection of the underlying soft tissues during first several days of decomposition. The preferred site for initial blowfly egg-laying (in case without trauma) is the natural orifices in the face (eyes, nose, and mouth) as specific sites for finding the first egg masses. This is due to the gases are generated during the body purging from the nose and mouth. It is displayed that when there are extensive colonies of maggots in certain area of the dead body, that are as old as or older than the colonies on the face, there is a strong evidence that some kind of trauma are occurred to that body region [130].

Detect substances in insect tissue (entomototoxicology)

Beyer *et al.* were the first to detect substances by analysis of insects collected from dead bodies [156]. Insect analysis could be used in cases where religious and ethical beliefs lead to problems. Insect analyses have many advantages such as greater sensitivity was obtained when using larvae instead of putrefied material. Moreover, drug concentrations are more stable in insects than post-mortem tissues [157]. This is because of storing of these chemicals within the molecular structure of the outer chitin covering of the insect [130] that can remain unaffected and unchanged for an extended period of time [158, 159].

The main goal of entomototoxicology is the determination of toxicant intake just before death, especially in highly decomposed and skeletonised remains. Entomototoxicology is largely organized around the two central inquiries that must be commonly answered in practice: first inquiry is about indirect evidence drawn from insects of whether a body was poisoned; the second inquiry is about whether the presence of toxicants must be taken into account whether it affects the development of insects in estimating PMI. Its scope involves qualitative and quantitative detection of toxicants with bearing in the mind multiple confounding factors that affect the interpretation of the results

ściowe i ilościowe wykrywanie substancji toksycznych z uwzględnieniem licznych czynników zakłócających, które wpływają na interpretację wyników, takich jak występowanie substancji toksycznych wykazujących tzw. tropizm tkankowy, zmiany przed- i pośmiertne, a także skuteczność ekstrakcji i wykrywania technik analitycznych. Przy szacowaniu PMI istotne znaczenie ma określenie, czy wynik ma związek ze spożytą substancją czy też stanowi artefakt [160]. W organizmach owadów wykrywane są liczne substancje (leki, metale, pestycydy) [151]. W badaniach próbek stosuje się analizę radioimmunologiczną, HPLC, GC, GC-MS, chromatografię cienkowarstwową oraz chromatografię cieczową ze spektrometrią mas [116, 159]. Opracowanie technik, które nie są niszczące ani inwazyjne dla owadów stanowiących materiał dowodowy, jest cenne, zwłaszcza jeśli dowody entomologiczne są potrzebne do innych analiz [161, 162]. Głównym wyzwaniem w entomotoksykologii jest brak rygorystycznej oceny wiarygodności kryminalistycznej dowodów entomotoksykologicznych. W laboratoriach toksykologicznych pilnie potrzebna jest zarówno odpowiednio prowadzona dokumentacja, jak i konsekwentne przestrzeganie standardowych procedur operacyjnych, aby umożliwić porównywanie i generalizację wyników badań [160].

Wykrywanie pozostałości po wystrale i wybuchu

Każdemu użyciu broni palnej towarzyszy pojawienie się tzw. nieorganicznych pozostałości po wystrale, w skład których wchodzi m.in. ołów (Pb), bar (Ba) i antymon (Sb). Roeterdink i wsp. wykryli je za pomocą spektrometrii mas sprzężonej z plazmą wzbudzaną indukcyjnie w larwach muchówek [163]. Wykazano też, że oznaczenie pozostałości po wystrale w tkance zależy bardziej od stadium rozkładu włók niż od czasu, jaki upłynął od śmierci [164]. Przy wykrywaniu nieorganicznych pozostałości po wystrale stosuje się skaningową mikroskopię elektronową w skojarzeniu ze spektroskopią rentgenowską z dyspersją energetyczną, ponieważ łączy ona w sobie analizę morfologiczną i elementarną. Jej ograniczeniem jest jednak to, że powoduje przemieszczanie się badanych cząsteczek.

Potwierdzono, że spektrometria emisyjna ze wzbudzeniem plazmowym stanowi potężne narzędzie do analizy pozostałości po wystrale. Umożliwia ona jednoczesne wykonywanie analiz ilościowych

such as toxicant tropism in the body, pre- and post-mortem changes and the extraction and detection efficiencies of the analytical techniques. It is important to determine whether the results are drug effects or artefacts to be able to calculate PMI [160]. A wide variety of substances (drugs, metals and pesticides) have been detected in insect of different species in a forensic context [151]. The analytical methods of insect samples have been used like radio-immune-analysis (RIA), HPLC, GC, GC-MS, thin layer chromatography (TLC) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) [116, 159]. With development of quantification methods which are not destructive or invasive to insect evidence, this could be of high value, especially if entomological evidence is also needed to other analysis [161, 162]. The main challenge of entomototoxicology is its validity as a source of forensic evidence and it has not been evaluated rigorously. Both well-documentation and consistent applied standard operating procedures (SOPs) are required urgently in toxicological laboratories to be able to compare and generalize the results of entomototoxicological research [160].

Detect gunshot and explosive residue

The lead (Pb), barium (Ba), and antimony (Sb) elements are the major chemical markers present in inorganic gunshot residues (GSR) released after one shot. In 2004, Roeterdink *et al.* detected these markers by used inductively coupled plasma mass spectrometry in flies larvae [163]. In 2010, revealed that the determination of gunshot residue in tissue was more dependent on decomposition stage rather than time since death [164]. Scanning electron microscopy with energy dispersive X-ray spectroscopy (SEM/EDS) was a common technique for the detection of GSR because it combines a morphological examination with elemental analysis. Despite the advantage of SEM/EDS, it has limitations in the technique itself with displacing particles of interest. In 2015, other study confirmed that inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP OES) is a powerful tool for GSR analysis, providing simultaneous quantification of Pb, Ba, and Sb with higher sensitivity than the traditional colorimetric (Feigl-Suter reaction) method [165]. Moreover, detection of explosive residues

Pb, Ba i Sb, zapewniając wyższy poziom czułości niż tradycyjna metoda kolorymetryczna (reakcja Feigla-Sutera) [165]. Pozwala również na wykrywanie pozostałości po wybuchu w próbkach entomologicznych. W jednym z badań porównywano larwy hodowane na mięsniu świńskim zawierającym trinitrotoluen (TNT) oraz w próbce niezawierającej TNT. W TNT wykryto też wiele innych pierwiastków, m.in. żelazo, aluminium, magnez i krzem [166].

Rozpoznawanie przypadków znęcania się i zaniedbania na podstawie muszycy

Muszycyca oznacza zażyciową kolonizację skóry ludzi i innych kręgowców przez larwy muchówek. Najczęściej ma związek z gatunkami przydatnymi z punktu widzenia medycyny sądowej, takimi jak *M. domestica*, *F. canicularis* i *C. vicina*. Nieuwzględnienie przez entomologa sądowego możliwości wystąpienia muszycy może skutkować nieprawidłową oceną PMI – szacowany czas od zgonu będzie wówczas dłuższy niż faktyczny [116]. Wydaliny organizmu ludzkiego (kał i mocz) przyciągają określone gatunki owadów, dlatego entomofauna zabezpieczona na ciele może wskazywać na znęcanie się (gwałt czy zaniedbanie) [167]. Niesamodzielna osoba z otwartą raną (osoby w bardzo młodym albo podeszłym wieku, a także chore i niepełnosprawne intelektualnie) jest narażona na ryzyko muszycy, a stwierdzenie kolonizacji larwami muchówek jest zwykle uznawane za dowód zaniedbania [9].

Identyfikacja sprawcy i ofiary (badanie zawartości jelita owadów)

Dostępne są techniki analizy ludzkiego DNA za pośrednictwem owadów żerujących na zwłokach [130]. Wszystkie owady hematofagiczne mogą dostarczać entomologom sądowym ważnych informacji. Najcenniejsze pod tym względem są komary, wszy, pchły i pluskwy. Na podstawie analizy spożytej przez nie krwi ludzkiej da się ustalić indywidualny profil DNA gospodarza. Wykazano, że dzięki muchówkom można uzyskać pełen profil ludzkiego DNA w przypadkach napaści na tle seksualnym (sprawcy i ofiary) oraz zaniedbania (przed śmiercią) [5]. Stwierdzono też, że larwy żerujące na rozkładających się tkankach zawierają oznaczalną ilość ludzkiego DNA [168], co może być istotne np. wtedy, gdy zwłoki zostały usu-

in entomological samples becomes also possible. This result depends on previous study that compared the larva reared on porcine muscle containing Trinitrotoluene (TNT) and non-TNT sample. This study detected also a very high count of other elements such as iron, aluminum, magnesium and silicon in TNT group [166].

Diagnosis of abuse and neglect cases by myiasis

Myiasis is the infestation of live human and vertebrate animals with dipterous larvae. In the forensic context, myiasis is most frequently associated with the forensically informative species such as *M. Domestica*, *F. canicularis* and *C. vicina*. If not fully appreciated, myiasis can cause confusion for the forensic entomologist, appearing to give PMI estimate longer than the actual time since death [116]. Using the knowledge that certain insects are attracted to bodily waste (faeces and urine), the insect fauna found on a body can be used to indicate cases of abuse (rape and neglect) [167]. Anybody with an open wound who is incapable of looking after themselves, such as the very young, old, ill and mentally incapacitated persons, is at risk of suffering from myiasis and the discovery of maggot infestation would usually be considered a sign of neglect [9].

Assailant and victim identification (maggot gut content studies)

Techniques for analyzing the human DNA in insects that feed on humans have been developed [130]. All haematophagous insects can be valuable forensic allies. The major insect groups being studied for these tests include the mosquitoes, lice, fleas and bed bugs. Analysis of their human blood meals can be done to obtain individual human DNA profile. It is demonstrated the ability to obtain a full human DNA profile from *Diptera* in cases of sexual violence (for assailant and victim) and neglect (prior to death) [5]. In addition to the blood-feeding insects, maggots feeding on decomposing human tissues have been tested for human DNA profile and found to retain testable levels [168]. This can be important in several circumstances; the dead body is removed from place of death, exten-

nięte z miejsca zgonu albo nastąpił ich daleko posunięty rozkład, a zabezpieczone na miejscu owady zawierające DNA ofiary są jedynym dowodem. Za pomocą tej techniki można również obalić hipotezę, że larwy zostały zebrane z innego miejsca [130].

Aby pomyślnie wyizolować DNA gospodarza z układu pokarmowego larw, potrzebne są etapy żerowania [168]. Donoszono jednak o skutecznym wyizolowaniu ludzkiego DNA z owadów w każdym stadium preimaginalnym, m.in. z dwudniowych poczwerek gatunku *C. dubia* [169]. Zarówno analizy ludzkiego mtDNA, jak i STR można potencjalnie wykorzystywać do ustalania powiązań między larwami a włókami ludzkimi, nawet jeśli nie doszło między nimi do bezpośredniego kontaktu fizycznego [32]. Standardową metodą wyznaczania ludzkich profili DNA jądrowego jest analiza krótkich powtórzeń tandemowych (STR). Sugerowaną metodą alternatywną w przypadku niepomyślnych efektów analizy STR jest analiza ludzkiego mtDNA [170]. W najnowszych badaniach zawartości jelita wykorzystywano STR jako markery obejmujące *loci* Y-STR, które są przydatne przy wykrywaniu ludzkiego męskiego DNA w próbce [171, 172]. Wielu autorów badało wpływ czasu [171] i rodzaju zabezpieczenia [165] na możliwość ekstrakcji DNA ofiary przestępstwa z treści jelitowej żerujących larw. Zehner i wsp. ustalili, że PMI wynoszące do 16 tygodni nie ma zauważalnego wpływu na jakość wyników [171], natomiast Linville i wsp. [174] wykazali, że larwy najlepiej przechowywać w temperaturze -70°C bez płynu konserwującego [173]. W niedawnym badaniu prowadzonym przy zastosowaniu NGS udało się opracować ludzki profil genetyczny na podstawie zawartości układu pokarmowego wszy głowowej [5].

Wnioski

Niezbędne są dalsze badania, które pozwolą na lepsze poznanie analiz entomologicznych i ustalenie źródeł potencjalnych błędów w ocenach. Pozwoli to wypełnić lukę, jaka niewątpliwie istnieje w dziedzinie ES. Zwiększenie liczby badań – zwłaszcza o charakterze interdyscyplinarnym i z zastosowaniem najnowocześniejszych technik – pozwoli na znaczne zwiększenie precyzji, dzięki czemu możliwe będzie dostosowanie dziedziny do ogólnych standardów naukowych i prawnych oraz kryteriów dopuszczalności dowodów w postępowaniu sądowym.

Autorzy deklarują brak konfliktu interesów.

sive decomposition occurred with leaving sizable maggots and no recovery of remains, and maggots with a victim's DNA would be proof that the person was dead. Also, this technique could be used to disprove allegation that maggots recovered from another crime scene [130].

It is displayed that the feeding stages usually are needed for the successful isolation of host DNA from the alimentary tract of the larvae [168]. However, it is reported that human DNA may be isolated from all stages of immatures, including two-day old pupae of *C. dubia* [169]. Both human mtDNA and STR analyses can potentially be used to link maggots with a human corpse, even if physical contact between the two is not observed [32]. Short tandem repeat (STR) analysis is the standard for the determination of human nuclear DNA profiles. It is proposed that analysis of human mtDNA as an alternative in case of unsuccessful STR analysis [170]. Recent gut content studies have used STR loci as markers including Y-STR loci which are useful for detecting human male DNA in a sample [171, 172]. Different authors studied the effect of time [171] and preservative conditions [165] on ability to extract victim DNA from gut content. Zehner *et al.* reported that up to 16 weeks PMI, there is no particular influence on the quality of the results [171] and Linville *et al.* [174] displayed that the best storage condition was observed from maggots stored without any preservation fluid at -70°C [173]. Recent study successfully used NGS to obtain a human profile from the gastrointestinal tract of head lice [5].

Conclusions

Future research must be directed to fully understand the underlying mechanisms and to identify the sources of error associated with entomological-based predictions. This pursuing will help to eradicate and fade the blank spot on the FE research map. In short, pursuing more FE researches especially multi-disciplinary ones with the new emerging techniques will lead to major improvements and precision in order to align the field with general requirements imposed by scientific and legal standards and be admissible in court.

The authors declare no conflict of interest.

Piśmiennictwo

References

1. Amendt J, Richards C, Campobasso CP, Zehner R, Hall MJ. Forensic entomology: applications and limitations. *Forensic Sci Med Pathol* 2011; 7: 379-392.
2. Tomberlin J, Mohr R, Benbow M, Tarone A, Vanlaerhoven S. A roadmap for bridging basic and applied research in forensic entomology. *Annu Rev Entomol* 2011; 56: 401-421.
3. McDonagh L, Thornton C, Wallman JE, Stevens JR. Development of an antigen-based rapid diagnostic test for the identification of blowfly (Calliphoridae) species of forensic significance. *Forensic Sci Int Genet* 2009; 3: 162-165.
4. Rodrigues RA, Azeredo-Espin AML, Torres TT. Microsatellite markers for population genetic studies of the blowfly *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104: 1047-1050.
5. Pilli E, Agostino A, Vergani D, et al. Human identification by lice: a next generation sequencing challenge. *Forensic Sci Int* 2016; 266: e71-e78.
6. Amendt J, Campobasso CP, Gaudry E, Reiter C, LeBlanc HN, Hall MJ. Best practice in forensic entomology – standards and guidelines. *Int J Legal Med* 2007; 121: 90-104.
7. Gaudry E, Dourel L. Forensic entomology: implementing quality assurance for expertise work. *Int J Legal Med* 2013; 127: 1031-1037.
8. Pereira F, Carneiro J, Amorim A. Identification of species with DNA-based technology: current progress and challenges. *Recent Pat DNA Gene Seq* 2008; 2: 187-200.
9. Gunn A. *Essential forensic biology*. John Wiley & Sons, 2011.
10. Bugelli V, Campobasso CP, Verhoff MA, Amendt J. Effects of different storage and measuring methods on larval length values for the blow flies (Diptera: Calliphoridae) *Lucilia sericata* and *Calliphora vicina*. *Sci Justice* 2017; 57: 159-164.
11. Byrd JH, Castner JL. *Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations*. CRC Press, Boca Raton 2009.
12. Aly SM, Wen J, Wang X, Cai J, Liu Q, Zhong M. Identification of forensically important arthropods on exposed remains during summer season in northeastern Egypt. *J Cent South Univ (Med Sci)* 2013; 38: 1-6.
13. Archer MS, Wallman JE. Context effects in forensic entomology and use of sequential unmasking in casework. *J Forensic Sci* 2016; 61: 1270-1277.
14. Arnaldos M, Garcia M, Romera E, Presa J, Luna A. Estimation of postmortem interval in real cases based on experimentally obtained entomological evidence. *Forensic Sci Int* 2005; 149: 57-65.
15. Klong-klaew T, Ngoen-klan R, Moophayak K, et al. Predicting Geographic Distribution of Forensically Significant Blow Flies of Subfamily Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae) in Northern Thailand. *Insects* 2018; 9: 106.
16. Wallman J, Donnellan S. The utility of mitochondrial DNA sequences for the identification of forensically important blowflies (Diptera: Calliphoridae) in southeastern Australia. *Forensic Sci Int* 2001; 120: 60-67.
17. Aly SM, Wen J. Molecular identification of forensically relevant Diptera inferred from short mitochondrial genetic marker. *Libyan J Med* 2013; 8: 20954.
18. Desmyter S, Gosselin M. COI sequence variability between Chrysomyinae of forensic interest. *Forensic Sci Int Genet* 2009; 3: 89-95.
19. Park JH, Shin SE, Ko KS, Park SH. Identification of Forensically Important Calliphoridae and Sarcophagidae Species Collected in Korea Using SNaPshot Multiplex System Targeting the Cytochrome c Oxidase Subunit I Gene. *BioMed Res Int* 2018; 2018: 2953892.
20. Preativatanyou K, Sirisup N, Payungporn S, et al. Mitochondrial DNA-based identification of some forensically important blowflies in Thailand. *Forensic Sci Int* 2010; 202: 97-101.
21. Smith JA, Baker NC. Molecular genetic identification of forensically important flies in the UK. *Forensic Sci Int Genet Supplement Series* 2008; 1: 620-622.
22. Stevens J, Wall R. Genetic relationships between blowflies (Calliphoridae) of forensic importance. *Forensic Sci Int* 2001; 120: 116-123.
23. Sukontason K, Bunchu N, Methanitikorn R, Chaiwong T, Kuntalue B, Sukontason K. Ultrastructure of adhesive device in fly in families calliphoridae, muscidae and sarcophagidae, and their implication as mechanical carriers of pathogens. *Parasitol Res* 2006; 98: 477-481.
24. Aly SM, Wen J. Applicability of partial characterization of cytochrome oxidase I in identification of forensically important flies (Diptera) from China and Egypt. *Parasitol Res* 2013; 112: 2667-2674.
25. Harvey M, Mansell M, Villet M, Dadour I. Molecular identification of some forensically important blowflies of southern Africa and Australia. *Med Vet Entomol* 2003; 17: 363-369.
26. Saigusa K, Takamiya M, Aoki Y. Species identification of the forensically important flies in Iwate prefecture, Japan based on mitochondrial cytochrome oxidase gene subunit I (COI) sequences. *Leg Med* 2005; 7: 175-178.
27. Ying BW, Liu TT, Fan H, et al. The application of mitochondrial DNA cytochrome oxidase II gene for the identification of forensically important blowflies in Western China. *Am J Forensic Med Pathol* 2007; 28: 308-313.

28. Poulin R, Randhawa HS. Evolution of parasitism along convergent lines: from ecology to genomics. *Parasitology* 2015; 142: S6-S15.
29. Sontigun N, Sukontason KL, Zajac BK, et al. Wing morphometrics as a tool in species identification of forensically important blow flies of Thailand. *Parasit Vectors* 2017; 10: 229.
30. Sperling FA, Anderson GS, Hickey D. A DNA-based approach to the identification of insect species used for postmortem interval estimation. *J Forensic Sci* 1994; 39: 418-427.
31. Vincent S, Vian JM, Carlotti MP. Partial sequencing of the cytochrome oxidase b subunit gene I: a tool for the identification of European species of blow flies for postmortem interval estimation. *J Forensic Sci* 2000; 45: 820-823.
32. Wells JD, Introna F, Di Vella G, Campobasso CP, Hayes J, Sperling FA. Human and insect mitochondrial DNA analysis from maggots. *J Forensic Sci* 2001; 46: 685-687.
33. Hurst GD, Jiggins FM. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proc Biol Sci* 2005; 272: 1525-1534.
34. Harvey M, Gaudieri S, Villet M, Dadour I. A global study of forensically significant calliphorids: implications for identification. *Forensic Sci Int* 2008; 177: 66-76.
35. Otranto D, Stevens JR. Molecular approaches to the study of myiasis-causing larvae. *Int J Parasitol* 2002; 32: 1345-1360.
36. McDonagh LM, Stevens JR. The molecular systematics of blowflies and screwworm flies (Diptera: Calliphoridae) using 28S rRNA, COX1 and EF-1 α : insights into the evolution of dipteran parasitism. *Parasitology* 2011; 138: 1760-1777.
37. Tourle R, Downie D, Villet M. Flies in the ointment: a morphological and molecular comparison of *Lucilia cuprina* and *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) in South Africa. *Med Vet Entomol* 2009; 23: 6-14.
38. Whitworth T, Dawson R, Magalon H, Baudry E. DNA barcoding cannot reliably identify species of the blowfly genus *Protophila* (Diptera: Calliphoridae). *Proc Royal Soc B* 2007; 274: 1731-1739.
39. Caterino MS, Cho S, Sperling FA. The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel. *Annu Rev Entomol* 2000; 45: 1-54.
40. Linacre A. Capillary electrophoresis of mtDNA cytochrome b gene sequences for animal species identification. *DNA Electrophoresis Protocols for Forensic Genetics*, Springer 2012: 321-329.
41. Junqueira ACM, Lessinger AC, Torres TT, et al. The mitochondrial genome of the blowfly *Chrysomya chloropyga* (Diptera: Calliphoridae). *Gene* 2004; 339: 7-15.
42. Hebert PD, Cywinska A, Ball SL. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Royal Soc B* 2003; 270: 313-321.
43. Draber-Mońko A, Malewski T, Pomorski J, Łoś M, Ślipiński P. On the Morphology and Mitochondrial DNA Barcoding of the Flesh Fly *Sarcophaga (Liopygia) Argyrostroma* (Diptera: Sarcophagidae) – An Important Species in Forensic Entomology. *Anna Zool* 2009; 59: 465-493.
44. Malewski T, Draber-Mońko A, Pomorski J, Łoś M, Bogdanowicz W. Identification of forensically important blowfly species (Diptera: Calliphoridae) by high-resolution melting PCR analysis. *Int J Legal Med* 2010; 124: 277-285.
45. Park SH, Zhang Y, Piao H, et al. Use of cytochrome c oxidase subunit I (COI) nucleotide sequences for identification of the Korean Luciliinae fly species (Diptera: Calliphoridae) in forensic investigations. *J Korean Med Sci* 2009; 24: 1058-1063.
46. Aly SM. Reliability of long vs short COI markers in identification of forensically important flies. *Croat Med J* 2014; 55: 19-26.
47. Nelson LA, Lambkin CL, Batterham P, et al. Beyond barcoding: A mitochondrial genomics approach to molecular phylogenetics and diagnostics of blowflies (Diptera: Calliphoridae). *Gene* 2012; 511: 131-142.
48. Koroiva R, de Souza MS, Roque FdO, Pepinelli M. DNA Barcodes for Forensically Important Fly Species in Brazil. *J Med Entomol* 2018; 55: 1055-1061.
49. Buenaventura E, Pape T. Multilocus and multiregional phylogeny reconstruction of the genus *Sarcophaga* (Diptera, Sarcophagidae). *Mole Phylogenetics Evol* 2017; 107: 619-629.
50. Wells J, Lunt N, Villet M. Recent African derivation of *Chrysomya putoria* from *C. chloropyga* and mitochondrial DNA paralogy of cytochrome oxidase subunit one in blowflies of forensic importance. *Med Vet Entomol* 2004; 18: 445-448.
51. Wells JD, Lee GM, Tomberlin JK, Kurahashi H. Molecular systematics of the endemic Hawaiian blowfly genus *Dyscritomyia* Grimshaw: Diptera: Calliphoridae. *Med Entomol Zoo* 2002; 53: 231-238.
52. Aly SM, Mahmoud SM. Molecular Identification of Forensically relevant Diptera: missed important criteria. *Int J Sci Res* 2016; 5: 139-140.
53. Aly SM, Mahmoud SM. COII "long fragment" reliability in characterisation and classification of forensically important flies. *Arch Med Sadowej Kryminol* 2017; 66: 95-105.
54. Baharum SN. Application of 16S rDNA and cytochrome b ribosomal markers in studies of lineage and fish populations structure of aquatic species. *Mol Bio Rep* 2012; 39: 5225-5232.
55. Li X, Cai J, Guo Y, et al. The availability of 16S rRNA for the identification of forensically important flies (Diptera: Muscidae) in China. *Trop Biomed* 2010; 27: 155-166.
56. Xinghua W, Jifeng C, Yadong G, et al. The availability of 16SrDNA gene for identifying forensically important blowflies in China. *Rom J Leg Med* 2010; 1: 43-50.



57. Cameron SL, Lambkin CL, Barker SC, Whiting MF. A mitochondrial genome phylogeny of Diptera: whole genome sequence data accurately resolve relationships over broad timescales with high precision. *Syst Entomol* 2007; 32: 40-59.
58. Parson W, Pegoraro K, Niederstätter H, Föger M, Steinlechner M. Species identification by means of the cytochrome b gene. *Int J Leg Med* 2000; 114: 23-28.
59. de Pablo RR, Salona M, Sarasola E, Cardoso S, de Pancorbo MM (eds.). Molecular identification of *Stearibia nigriceps*: An example of the usefulness of Cytochrome b gene for the identification of entomofauna species. *International Congress Series*, Elsevier 2006.
60. Taylor M, McKechnie SW, Pierce N, Kreitman M. The lepidopteran mitochondrial control region: structure and evolution. *Mol Biol Evol* 1993; 10: 1259-1272.
61. Shadel GS, Clayton DA. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu Rev Biochem* 1997; 66: 409-435.
62. Hua J, Li M, Dong P, Cui Y, Xie Q, Bu W. Comparative and phylogenomic studies on the mitochondrial genomes of Pentatomomorpha (Insecta: Hemiptera: Heteroptera). *BMC Genomics* 2008; 9: 610.
63. Zhao L, Zheng Z-M, Huang Y, Zhou Z, Wang L. Comparative analysis of the mitochondrial control region in Orthoptera. *Zool Stud* 2011;50(3):385-393.
64. Bruhn T. Sequence and analysis of the mitochondrial DNA control region of nine Australian species of the genus *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) 2011.
65. Duarte GT, De Azeredo-Espin AML, Junqueira ACM. The mitochondrial control region of blowflies (Diptera: Calliphoridae): a hot spot for mitochondrial genome rearrangements. *J Med Entomol* 2008; 45: 667-676.
66. Lessinger AC, Junqueira ACM, Conte FF, Azeredo-Espin AML. Analysis of a conserved duplicated tRNA gene in the mitochondrial genome of blowflies. *Gene* 2004; 339: 1-6.
67. Ramakodi MP, Singh B, Wells JD, Guerrero F, Ray DA. A 454 sequencing approach to dipteran mitochondrial genome research. *Genomics* 2015; 105: 53-60.
68. Aly SM, Sabri DM. Next generation sequencing (NGS): a golden tool in forensic toolkit. *Arch Med Sadowej Kryminol* 2015; 65: 260-271.
69. Chimeno C, Morinière J, Podhorna J, et al. DNA Barcoding in Forensic Entomology – Establishing a DNA Reference Library of Potentially Forensic Relevant Arthropod Species. *J Forensic Sci* 2019; 64: 593-601.
70. Zaidi F, Wei S-J, Shi M, Chen X-X. Utility of multi-gene loci for forensic species diagnosis of blowflies. *J Insect Sci* 2011; 11: 59.
71. Gurney T, Ethel R, Ratnapradipa D, Bossard R. Introduction to the molecular phylogeny of insects. *Tested studies for laboratory teaching*. Karcher SJ (ed.). *Proceedings of the 21st Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education* 2000; 21: 63-79.
72. Shapoval NA, Lukhtanov VA. Intragenomic variations of multicopy ITS2 marker in *Agrodiaetus* blue butterflies (Lepidoptera, Lycaenidae). *Comp Cytogenet* 2015; 9: 483-397.
73. Kengne P, Antonio-Nkondjio C, Awono-Ambene H, Simard F, Awolola T, Fontenille D. Molecular differentiation of three closely related members of the mosquito species complex, *Anopheles moucheti*, by mitochondrial and ribosomal DNA polymorphism. *Med Vet Entomol* 2007; 21: 177-182.
74. Van Bortel W, Trung H, Roelants P, Harbach R, Backeljau T, Coosemans M. Molecular identification of *Anopheles minimus* sl beyond distinguishing the members of the species complex. *Insect Mol Biol* 2000; 9: 335-340.
75. Stage DE, Eickbush TH. Sequence variation within the rRNA gene loci of 12 *Drosophila* species. *Genome Res* 2007; 17: 1888-1897.
76. Nelson L, Wallman JF, Dowton M. Using COI barcodes to identify forensically and medically important blowflies. *Med Vet Entomol* 2007; 21: 44-52.
77. Song Z, Wang X, Liang G. Species identification of some common necrophagous flies in Guangdong province, southern China based on the rDNA internal transcribed spacer 2 (ITS2). *Forensic Sci Int* 2008; 175: 17-22.
78. Raupach MJ, Astrin JJ, Hannig K, Peters MK, Stoeckle MY, Wägele J-W. Molecular species identification of Central European ground beetles (Coleoptera: Carabidae) using nuclear rDNA expansion segments and DNA barcodes. *Front Zool* 2010; 7: 26.
79. Bajpai N, Tewari RR. Mitochondrial DNA sequence-based phylogenetic relationship among flesh flies of the genus *Sarcophaga* (Sarcophagidae: Diptera). *J Genet* 2010; 89: 51-54.
80. Wallman JF, Leys R, Hogendoorn K. Molecular systematics of Australian carrion-breeding blowflies (Diptera: Calliphoridae) based on mitochondrial DNA. *Invertebr Syst* 2005; 19: 1-15.
81. Zehner R, Amendt J, Schütt S, Sauer J, Krettek R, Povolný D. Genetic identification of forensically important flesh flies (Diptera: Sarcophagidae). *Int J Leg Med* 2004; 118: 245-247.
82. Amendt J, Krettek R. Forensic entomology. *Naturwissenschaften* 2004; 91: 51-65.
83. Stevens J, Wall R, Wells J. Paraphyly in Hawaiian hybrid blowfly populations and the evolutionary history of anthropophilic species. *Insect Mol Biol* 2002; 11: 141-148.
84. Mazzanti M, Alessandrini F, Tagliabracci A, Wells JD, Campobasso CP. DNA degradation and genetic analysis of empty puparia: genetic identification limits in forensic entomology. *Forensic Sci Int* 2010; 195: 99-102.

85. Tan SH, Rizman-Idid M, Mohd-Aris E, Kurahashi H, Mohamed Z. DNA-based characterisation and classification of forensically important flesh flies (Diptera: Sarcophagidae) in Malaysia. *Forensic Sci Int* 2010; 199: 43-49.
86. Wells JD, Sperling FA. DNA-based identification of forensically important *Chrysomyinae* (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Sci Int* 2001; 120: 110-115.
87. Wells JD, Wall R, Stevens JR. Phylogenetic analysis of forensically important *Lucilia* flies based on cytochrome oxidase I sequence: a cautionary tale for forensic species determination. *Int J Legal Med* 2007; 121: 229-233.
88. Aly SM, Wen J, Wang X. Identification of forensically important Sarcophagidae (Diptera) based on partial mitochondrial cytochrome oxidase I and II genes. *Am J Forensic Med Pathol* 2013; 34: 159-163.
89. Sonet G, Jordaens K, Braet Y, Desmyter S. Why is the molecular identification of the forensically important blowfly species *Lucilia caesar* and *L. illustris* (family Calliphoridae) so problematic? *Forensic Sci Int* 2012; 223: 153-159.
90. Picard CJ, Wells JD, Ulylyot A, Rognes K. Amplified fragment length polymorphism analysis supports the valid separate species status of *Lucilia caesar* and *L. illustris* (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Sci Res* 2018; 3: 60-64.
91. Belosludtsev YY, Bowerman D, Weil R, et al. Organism identification using a genome sequence-independent universal microarray probe set. *Biotechniques* 2004; 37: 654-660.
92. Wells JD, Stevens JR. Application of DNA-based methods in forensic entomology. *Annu Rev Entomol* 2008; 53: 103-120.
93. Wallman JF, Adams M. The forensic application of allozyme electrophoresis to the identification of blowfly larvae (Diptera: Calliphoridae) in southern Australia. *J Forensic Sci* 2001; 46: 681-684.
94. Malewski T, Draber-Mońko A, Pomorski J, Łoś M, Bogdanowicz W. Identification of forensically important blowfly species (Diptera: Calliphoridae) by high-resolution melting PCR analysis. *Int J Leg Med* 2010; 124: 277-285.
95. Winder L, Phillips C, Richards N, et al. Evaluation of DNA melting analysis as a tool for species identification. *Methods Ecol Evol* 2011; 2: 312-320.
96. Picard C, Johnston J, Tarone A. Genome sizes of forensically relevant Diptera. *J Med Entomol* 2012; 49: 192-197.
97. Thompson CR, Brogan RS, Scheifele LZ, Rivers DB. Bacterial interactions with necrophagous flies. *Ann Entomol Soc Am* 2013; 106: 799-809.
98. Vogel H, Shukla SP, Engl T, et al. The digestive and defensive basis of carcass utilization by the burying beetle and its microbiota. *Nat Commun* 2017; 9: 15186.
99. Ma Q, Fonseca A, Liu W, et al. *Proteus mirabilis* interkingdom swarming signals attract blow flies. *ISME J* 2012; 6: 1356-1366.
100. Tomberlin JK, Crippen TL, Tarone AM, et al. Interkingdom responses of flies to bacteria mediated by fly physiology and bacterial quorum sensing. *Anim Behav* 2012; 84: 1449-1456.
101. Frederickx C, Dekeirsschieter J, Verheggen FJ, Haubruge E. Responses of *Lucilia sericata* Meigen (Diptera: Calliphoridae) to cadaveric volatile organic compounds. *J Forensic Sci* 2012; 57: 386-390.
102. de Lima LAS, Baia TC, Gama RA, da Silva Gasparotto LH, Lima KM. Near infrared spectroscopy as an emerging tool for forensic entomotoxicology. *NIR News* 2014; 25: 5-7.
103. De Lima MG, Moura MO, Arizaga GGC. Barcoding without DNA? Species identification using near infrared spectroscopy. *Zootaxa* 2011; 2933: 46-54.
104. Barbosa TM, de Lima LA, dos Santos MC, Vasconcelos SD, Gama RA, Lima KM. A novel use of infra-red spectroscopy (NIRS and ATR-FTIR) coupled with variable selection algorithms for the identification of insect species (Diptera: Sarcophagidae) of medico-legal relevance. *Acta Trop* 2018; 185: 1-12.
105. Tarone AM, Foran DR. Gene expression during blow fly development: improving the precision of age estimates in forensic entomology. *J Forensic Sci*. 2011; 56 (Suppl 1): S112-122.
106. Ma T, Huang J, Wang J-F. Study on the pupal morphogenesis of *Chrysomya rufifacies* (Macquart)(Diptera: Calliphoridae) for postmortem interval estimation. *Forensic Sci Int* 2015; 253: 88-93.
107. Salazar-Souza M, Couri MS, Aguiar VM. Chronology of the Intrapuparial Development of the Blowfly *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae): Application in Forensic Entomology. *J Med Entomol* 2018; 55: 825-832.
108. Fremdt H, Amendt J, Zehner R. Diapause-specific gene expression in *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) – a useful diagnostic tool for forensic entomology. *Int J Leg Med* 2014; 128: 1001-1011.
109. Martínez-Sánchez A, Magaña C, Rojo S (eds.). First data about forensic importance of *Protophormia terranova* (Robineau-Desvoidy, 1830) in Spain (Diptera: Calliphoridae). Proceedings of the fifth meeting of the European association for forensic entomology. EAFE, Brussels 2007.
110. Mendonça PM, Dos Santos-Mallet JR, De Carvalho Queiroz MM. Ultrastructure of immature stages of the blowfly *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1818) (Diptera: Calliphoridae). *Microsc Res Tech* 2012; 75: 206-211.
111. Flores D, Miller AL, Showman A, et al. Fluorescence Imaging of Posterior Spiracles from Second and Third Instars of Forensically Important *Chrysomya rufifacies* (Diptera: Calliphoridae). *J Forensic Sci* 2016; 61: 1578-1587.
112. Richards CS, Simonsen TJ, Abel RL, Hall MJ, Schwyn DA, Wicklein M. Virtual forensic entomology: improving estimates of minimum post-mortem interval with 3D micro-computed tomography. *Forensic Sci Int* 2012; 220: 251-264.
113. Giffen JE, Rosati JY, Longo CM, Musah RA. Species Identification of Necrophagous Insect Eggs Based on Amino Acid Profile Differences Revealed by Direct Analysis in Real Time-High Resolution Mass Spectrometry. *Anal Chem* 2017; 89: 7719-7726.

114. Vafopoulou X, Steel CG. Cytoplasmic travels of the ecdysteroid receptor in target cells: pathways for both genomic and non-genomic actions. *Front Endocrinol* 2012; 3: 43.
115. Gaudry E, Blais C, Maria A, Dauphin-Villemant C. Study of steroidogenesis in pupae of the forensically important blow fly *Protophormia terraenovae* (Robineau-Desvoidy)(Diptera: Calliphoridae). *Forensic Sci Int* 2006; 160: 27-34.
116. Amendt J, Campobasso CP, Goff ML, Grassberger M. Current concepts in forensic entomology: Springer 2010.
117. Roux O, Gers C, Legal L. Ontogenetic study of three Calliphoridae of forensic importance through cuticular hydrocarbon analysis. *Med Vet Entomol* 2008; 22: 309-317.
118. Pechal JL, Moore H, Drijfhout F, Benbow ME. Hydrocarbon profiles throughout adult Calliphoridae aging: A promising tool for forensic entomology. *Forensic Sci Int* 2014; 245: 65-71.
119. Bernhardt V, Pogoda W, Verhoff MA, Toennes SW, Amendt J. 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* 2017; 57: 361-365.
120. Zhu G-H, Jia Z-J, Yu X-J, et al. Predictable weathering of puparial hydrocarbons of necrophagous flies for determining the postmortem interval: a field experiment using *Chrysomya rufifacies*. *Int J Legal Med* 2017; 131: 885-894.
121. Zhu G, Ye G, Li K, Hu C, Xu X. Determining the age of adult flesh flies, *Boettcherisca peregrina*, using pteridine fluorescence. *Med Vet Entomol* 2013; 27: 59-63.
122. Cammack J, Reiskind M, Guisewite L, Denning S, Watson D. Quantifying pteridines in the heads of blow flies (Diptera: Calliphoridae): Application for forensic entomology. *Forensic Sci Int* 2017; 280: 44-48.
123. Mail T, Chadwick J, Lehane M. Determining the age of adults of *Stomoxys calcitrans* (L.)(Diptera: Muscidae). *Bull Entomol Res* 1983; 73: 501-525.
124. Tarone AM, Jennings KC, Foran DR. Aging blow fly eggs using gene expression: a feasibility study. *J Forensic Sci* 2007; 52: 1350-1354.
125. Boehme P, Spahn P, Amendt J, Zehner R. Differential gene expression during metamorphosis: a promising approach for age estimation of forensically important *Calliphora vicina* pupae (Diptera: Calliphoridae). *Int J Legal Med* 2013; 127: 243-249.
126. George KA, Archer MS, Toop T. Correlation of Molecular Expression with Diel Rhythm of Oviposition in *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy)(Diptera: Calliphoridae) and Implications for Forensic Entomology. *J Forensic Sci* 2015; 60: S108-S15.
127. Zajac BK, Amendt J, Horres R, Verhoff MA, Zehner R. De novo transcriptome analysis and highly sensitive digital gene expression profiling of *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) pupae using MACE (Massive Analysis of cDNA Ends). *Forensic Sci Int Genet* 2015; 15: 137-146.
128. Zajac BK, Amendt J, Verhoff MA, Zehner R. Dating Pupae of the Blow Fly *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy 1830 (Diptera: Calliphoridae) for Post Mortem Interval – Estimation: Validation of Molecular Age Markers. *Genes* 2018; 9: 153.
129. Federico C, Lombardo D, La Porta N, et al. Rapid molecular identification of necrophagous diptera by means of variable-length intron sequences in the wingless gene. *J Forensic Leg Med* 2018; 56: 66-72.
130. Williams RE, Haskell NH. *Entomology & death: A procedural guide*. East Park Printing, 2008.
131. Alacs EA, Georges A, FitzSimmons NN, Robertson J. DNA detective: a review of molecular approaches to wildlife forensics. *Forensic Sci Med Pathol* 2010; 6: 180-194.
132. Benecke M. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) typing of necrophageous insects (diptera, coleoptera) in criminal forensic studies: validation and use in practice I. *Forensic Sci Int* 1998; 98: 157-168.
133. Skoda S, Pornkulwat S, Foster JE. Random amplified polymorphic DNA markers for discriminating *Cochliomyia hominivorax* from *C. macellaria* (Diptera: Calliphoridae). *Bull Entomol Res* 2002; 92: 89-96.
134. Stevens J, Wall R. The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for studies of genetic variation in populations of the blowfly *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) in southern England. *Bull Entomol Res* 1995; 85: 549-555.
135. Picard C, Wells J. Survey of the genetic diversity of *Phormia regina* (Diptera: Calliphoridae) using amplified fragment length polymorphisms. *J Med Entomol* 2009; 46: 664-670.
136. Picard CJ, Wells JD. The population genetic structure of North American *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae), and the utility of genetic assignment methods for reconstruction of postmortem corpse relocation. *Forensic Sci Int* 2010; 195: 63-67.
137. Marquez J, Krafur E. Mitochondrial diversity evaluated by the single strand conformation polymorphism method in African and North American house flies (*Musca domestica* L.). *Insect Mol Bio* 2003; 12: 99-106.
138. Jain SK, Neekhra B, Pandey D, Jain K. RAPD marker system in insect study: A review. *Indian J. Biotechnol* 2010; 9: 7-12.
139. Baudry E, Bartos J, Emerson K, Whitworth T, Werren J. Wolbachia and genetic variability in the birdnest blowfly *Protocalliphora sialia*. *Mol Ecol* 2003; 12: 1843-1854.
140. Beckert JC, Friedland DE, Wallace MM. Genotyping diptera using amplified fragment length polymorphism (AFLP): development of a genetic marker system for species in the families Calliphoridae and Sarcophagidae. *Aust J Forensic Sci* 2010; 42: 141-152.
141. Chua TH, Chong Y. Role of Polymerase Chain Reaction in Forensic Entomology. *Polymerase Chain Reaction*. InTech, 2012.
142. Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet* 2004; 5: 435.
143. Pons J, Bruvo B, Juan C, Petitpierre E, Plohl M, Ugarković D. Conservation of satellite DNA in species of the genus *Pimelia* (Tenebrionidae, Coleoptera). *Gene* 1997; 205: 183-190.

144. Schlötterer C, Ritter R, Harr B, Brem G. High mutation rate of a long microsatellite allele in *Drosophila melanogaster* provides evidence for allele-specific mutation rates. *Mol Biol Evol* 1998; 15: 1269-1274.
145. Cornuet J-M, Piry S, Luikart G, Estoup A, Solignac M. New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics* 1999; 153: 1989-2000.
146. Florin AB, Gyllenstrand N. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in the blowflies *Lucilia illustris* and *Lucilia sericata*. *Mol Ecol Notes* 2002; 2: 113-116.
147. Torres TT, DE Azeredo-Espin AML. Characterization of polymorphic microsatellite markers for the blowfly *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae). *Mol Ecol Resour* 2008; 8: 208-210.
148. He L, Wang S, Miao X, Wu H, Huang Y. Identification of necrophagous fly species using ISSR and SCAR markers. *Forensic Sci Int* 2007; 168: 148-153.
149. Zheng X, Hu J, Kunnon SP, Xiaoguang C. Identification of necrophagous fly species from 12 different cities in China using ISSR and SCAR markers. *Asian Pac J Trop Med* 2010; 3: 510-514.
150. Megléc E, Solignac M. Microsatellite loci for *Parnassius mnemosyne* (Lepidoptera). *Hereditas* 1998; 128: 179-180.
151. Farncombe K, Beresford D, Kyle C. Characterization of microsatellite loci in *Phormia regina* towards expanding molecular applications in forensic entomology. *Forensic Sci Int* 2014; 240: 122-125.
152. Divne A-M, Edlund H, Allen M. Forensic analysis of autosomal STR markers using Pyrosequencing. *Forensic Sci Int Genet* 2010; 4: 122-129.
153. Lee JC, Tseng B, Chang LK, Linacre A. SEQ Mapper: A DNA sequence searching tool for massively parallel sequencing data. *Forensic Sci Int Genet* 2017; 26: 66-69.
154. Duforet-Frebourg N, Gattepaille LM, Blum MG, Jakobsson M. HaploPOP: a software that improves population assignment by combining markers into haplotypes. *BMC Bioinformatics* 2015; 16: 242.
155. Hoffman EM, Curran AM, Dulgerian N, Stockham RA, Eckenrode BA. Characterization of the volatile organic compounds present in the headspace of decomposing human remains. *Forensic Sci Int* 2009; 186: 6-13.
156. Beyer J, Enos W, Stajić M. Drug identification through analysis of maggots. *J Forensic Sci* 1980; 25: 411-412.
157. Gosselin M, Wille SM, Fernandez Mdel M, et al. Entomotoxicology, experimental set-up and interpretation for forensic toxicologists. *Forensic Sci Int* 2011; 208: 1-9.
158. Bourel B, Tournel G, Hedouin V, Deveaux M, Goff ML, Gosset D. Morphine extraction in necrophagous insects remains for determining ante-mortem opiate intoxication. *Forensic Sci Int* 2001; 120: 127-131.
159. Chophi R, Sharma S, Sharma S, Singh R. Forensic entomotoxicology: Current concepts, trends and challenges. *J Forensic Leg Med* 2019; 67: 28-36.
160. da Silva EI, Wilhelmi B, Villet MH. Forensic entomotoxicology revisited-towards professional standardisation of study designs. *Int J Leg Med* 2017; 131: 1399-1412.
161. Baia TC, Gama RA, de Lima LAS, Lima KM. FTIR microspectroscopy coupled with variable selection methods for the identification of flunitrazepam in necrophagous flies. *Anal Methods* 2016; 8: 968-972.
162. Oliveira JS, Baia TC, Gama RA, Lima KM. Development of a novel non-destructive method based on spectral fingerprint for determination of abused drug in insects: An alternative entomotoxicology approach. *Microchem J* 2014; 115: 39-46.
163. Roeterdink EM, Dadour IR, Watling RJ. Extraction of gunshot residues from the larvae of the forensically important blowfly *Calliphora dubia* (Macquart) (Diptera: Calliphoridae). *Int J Legal Med* 2004; 118: 63-70.
164. LaGoo L, Schaeffer LS, Szymanski DW, Smith RW. Detection of gunshot residue in blowfly larvae and decomposing porcine tissue using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *J Forensic Sci* 2010; 55: 624-632.
165. Motta LC, Vanini G, Chamoun CA, et al. Detection of Pb, Ba, and Sb in blowfly larvae of porcine tissue contaminated with gunshot residue by ICP OES. *J Chem* 2015; 2015: 737913.
166. Cruz AM. Crime Scene Intelligence. An Experiment in Forensic Entomology. NDIC Press, Washington DC 2006.
167. Benecke M. Forensic Entomology: The Next Step. *Forensic Sci Int* 2001; 120: 1.
168. Skowronek R, Tomsia M, Drożdżiok K, Kabiesz J. Insects feeding on cadavers as an alternative source of human genetic material. *Arch Med Sadowej Kryminol* 2014; 64: 254-267.
169. Campobasso CP, Linville JG, Wells JD, Introna F. Forensic genetic analysis of insect gut contents. *Amer J Forensic Med Pathol* 2005; 26: 161-165.
170. Carvalho F, Dadour IR, Groth DM, Harvey ML. Isolation and detection of ingested DNA from the immature stages of *Calliphora dubia* (diptera: Calliphoridae). *Forensic Sci Med Pathol* 2005; 1: 261-265.
171. Zehner R, Amendt J, Krettek R. STR typing of human DNA from fly larvae fed on decomposing bodies. *J Forensic Sci* 2004; 49: 337-340.
172. Clery JM. Stability of prostate specific antigen (PSA), and subsequent Y-STR typing, of *Lucilia* (*Phaenicia*) *sericata* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae) maggots reared from a simulated postmortem sexual assault. *Forensic Sci Int* 2001; 120: 72-76.



173. de Lourdes Chavez-Briones M, Hernandez-Cortes R, Diaz-Torres P, et al. Identification of human remains by DNA analysis of the gastrointestinal contents of fly larvae. *J Forensic Sci* 2013; 58: 248-250.
174. Linville JG, Hayes J, Wells JD. Mitochondrial DNA and STR analyses of maggot crop contents: effect of specimen preservation technique. *J Forensic Sci* 2004; 49: 341-344.

Adres do korespondencji

Sanaa M. Aly
Department of Forensic Medicine and Clinical Toxicology
Faculty of Medicine
Suez Canal University
41522, Ismailia, Egypt
e-mail: sasydayem@hotmail.com

Nadesłano: 26.06.2019

Zaakceptowano: 11.11.2019

Address for correspondence

Sanaa M. Aly
Department of Forensic Medicine and Clinical Toxicology
Faculty of Medicine
Suez Canal University
41522, Ismailia, Egypt
e-mail: sasydayem@hotmail.com

Submitted: 26.06.2019

Accepted: 11.11.2019

