



archiwum medycyny sądowej i kryminologii

Praca pogładowa
Review paper

Rafał Skowronek, Marcin Tomsia, Kornelia Drożdżiok, Jadwiga Kabiesz

Owady żerujące na zwłokach jako alternatywne źródło ludzkiego materiału genetycznego

Insects feeding on cadavers as an alternative source of human genetic material

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej i Toksykologii Sądowo-Lekarskiej, Wydział Lekarski w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Polska
Department of Forensic Medicine and Forensic Toxicology, School of Medicine in Katowice, Medical University of Silesia, Katowice, Poland

Streszczenie

W niektórych sprawach kryminalnych wykorzystanie klasycznych źródeł ludzkiego materiału genetycznego jest utrudnione lub nawet niemożliwe. Rozwiązaniem może być wykorzystanie owadów, zwłaszcza larw muchówek, żerujących na zwłokach. Aktualny przegląd opisów przypadków oraz badań eksperymentalnych dostępnych w bazach biomedycznych wykazał, że owady mogą stanowić cenne źródło ludzkiego kwasu dezoksyrybonukleinowego (DNA), zarówno mitochondrialnego, jak i genomowego, umożliwiającego efektywną analizę, odpowiednio sekwencji regionów hiperzmiennych (HVR) i profili krótkich powtórzeń tandemowych (STR). Optymalnym źródłem ludzkiego DNA jest wole (część jelita) aktywnych larw muchówek III stadium. *Puparia* i wydaliny owadów również mogą być wykorzystane w praktyce genetyczno-sądowej zamiast zawartości przewodu pokarmowego.

Słowa kluczowe: entomologia sądowa, genetyka sądowa, larwy muchówek, identyfikacja osobnicza.

Abstract

In some criminal cases, the use of classical sources of human genetic material is difficult or even impossible. One solution may be the use of insects, especially blowfly larvae which feed on corpses. A recent review of case reports and experimental studies available in biomedical databases has shown that insects can be a valuable source of human mitochondrial and genomic deoxyribonucleic acid (DNA), allowing for an effective analysis of hypervariable region (HVR) sequences and short tandem repeat (STR) profiles, respectively. The optimal source of human DNA is the crop (a part of the gut) of active third-instar blowfly larvae. Pupae and insect faeces can be also used in forensic genetic practice instead of the contents of the alimentary tract.

Key words: forensic entomology, forensic genetics, blowfly larvae, personal identification.

Wprowadzenie

Entomologia sądowa stopniowo zyskuje coraz większe uznanie wśród przedstawicieli organów ści-

Introduction

Forensic entomology has been steadily gaining recognition from representatives of law enforcement

gania i wymiaru sprawiedliwości na całym świecie, w tym także w Polsce [1]. Jest to spowodowane m.in. stale rosnącą liczbą możliwych zastosowań owadów nekrofilnych i ich pozostałości w miejscu ujawnienia zwłok (tzw. śladów entomologicznych) w medycynie, toksykologii i genetyce sądowej [2]. Obecnie ich zakres zdecydowanie wykracza poza klasyczne szacowanie czasu zgonu metodą entomologiczną [3]. Można zauważyć, że w obrębie samej entomologii sądowej wyodrębniają się nowe subdyscypliny, takie jak entomotoksykologia, „wirtualna” entomologia sądowa, archeoentomologia funeralna itp. [4–6].

Jedną z nowszych, możliwych aplikacji materiału entomologicznego jest wykorzystanie treści pokarmowej jelita owadów (głównie larw muchówek) żerujących na zwłokach ludzkich i ich wydaliny jako alternatywnego źródła ludzkiego materiału genetycznego, pozwalającego na analizę sekwencji genomowego i mitochondrialnego DNA (mtDNA) [7, 8].

Analiza genetyczna pokarmu spożytego przez owady nekrofagiczne może być przydatna w sytuacjach:

- gdy na miejscu przestępstwa obecne są jedynie larwy, a zwłoki zostały stamtąd wcześniej usunięte po częściowym lub całkowitym rozkładzie (w celu uzyskania profilu genetycznego i identyfikacji nieznanego zwłok) [9, 10];
- gdy na zwłokach, w przeciwieństwie do otoczenia, nie stwierdza się obecności owadów lub w pobliżu znajduje się alternatywne źródło pokarmu (w celu potwierdzenia lub wykluczenia żerowania zabezpieczonych okazów na ludzkich zwłokach, a zatem możliwości ich dalszego wykorzystania w ekspertyzie; wykluczenie przypadkowego lub celowego naniesienia „fałszywych” śladów entomologicznych) [11–13];
- rozkawałkowania zwłok (w celu potwierdzenia wspólnego pochodzenia szczątków ujawnionych w różnych miejscach) [14].

Autorzy niniejszej pracy dokonali przeglądu opisów przypadków udanej izolacji kwasów nukleinowych z larw żerujących na zwłokach ludzkich oraz odpowiednich badań eksperymentalnych dostępnych w bazach medycznych w celu przedstawienia aktualnego stanu wiedzy w tym wspólnym obszarze zainteresowań medycyny, entomologii i genetyki sądowej.

Przewód pokarmowy larw muchówek

Przewód pokarmowy larw muchówek rozpoczyna się otworem gębowym w ryjku, a kończy w ostat-

niach i systemie sądownictwa na całym świecie, w tym także w Polsce [1]. Tendencja ta może być przypisana, między innymi, do zwiększającej się liczby możliwych zastosowań owadów nekrofilnych i ich pozostałości w miejscu odkrycia zwłok (tzw. dowodów entomologicznych) w medycynie, toksykologii i genetyce sądowej [2]. Obecne zastosowania owadów nekrofilnych wykraczają daleko poza tradycyjną ocenę czasu od śmierci metodą entomologiczną [3]. Jest również godne uwagi, że w ramach samej entomologii sądowej powstają nowe subdyscypliny, takie jak entomotoksykologia, „wirtualna” entomologia sądowa, archeoentomologia funeralna itp. [4–6].

Wskazaniem na jedną z najnowszych, możliwych aplikacji materiału entomologicznego jest wykorzystanie treści pokarmowej i kału owadów (głównie larw muchówek) żywiących się zwłokami ludzkimi i ich odchodami jako alternatywnego źródła ludzkiego materiału genetycznego, umożliwiające analizę sekwencji genomowego i mitochondrialnego DNA (mtDNA) [7, 8].

Analiza genetyczna pokarmu zjedzonego przez owady nekrofagiczne może być przydatna w następujących przypadkach:

- gdy na miejscu przestępstwa obecne są jedynie larwy, a zwłoki zostały stamtąd wcześniej usunięte po częściowym lub całkowitym rozkładzie (w celu uzyskania profilu genetycznego i identyfikacji nieznanego zwłok) [9, 10];
- gdy na zwłokach, w przeciwieństwie do otoczenia, nie stwierdza się obecności owadów lub w pobliżu znajduje się alternatywne źródło pokarmu (w celu potwierdzenia lub wykluczenia żerowania zabezpieczonych okazów na ludzkich zwłokach, a zatem możliwości ich dalszego wykorzystania w ekspertyzie; wykluczenie przypadkowego lub celowego naniesienia „fałszywych” śladów entomologicznych) [11–13];
- rozkawałkowania zwłok (w celu potwierdzenia wspólnego pochodzenia szczątków ujawnionych w różnych miejscach) [14].

Autorzy niniejszej pracy dokonali przeglądu opisów przypadków udanej izolacji kwasów nukleinowych z larw żerujących na zwłokach ludzkich oraz odpowiednich badań eksperymentalnych dostępnych w bazach medycznych w celu przedstawienia aktualnego stanu wiedzy w tym wspólnym obszarze zainteresowań medycyny, entomologii i genetyki sądowej.

Alimentaryary canal of blowfly larvae

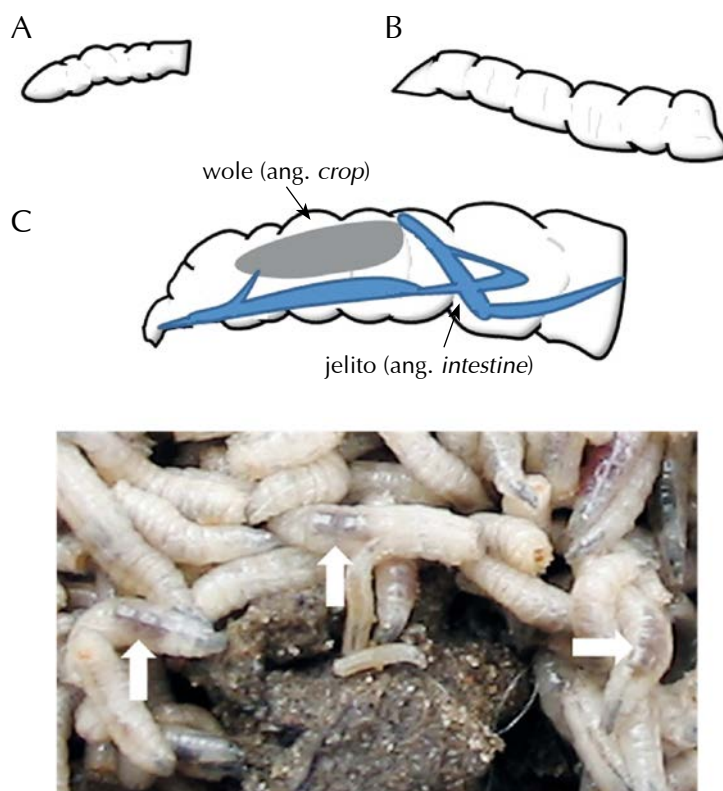
The alimentary canal of blowfly larvae begins with the mouth located in the snout, and ends with the rec-

nim segmencie odwłoka otworem odbytowym [15]. Składa się z trzech morfologicznie i ontologicznie różnych części – jelita przedniego, środkowego i tylnego. W obrębie jelita przedniego przelyk bez wyraźnej granicy przechodzi w wole (łac. *ingluvies*, ang. *crop*), które wypełnione u larw III stadium jest dobrze widoczne nawet gołym okiem i tym samym łatwe do identyfikacji (ciemne pole wewnątrz larwy w jej przedniej części; ryc. 1.). Kolor i długość wola można wykorzystać przy ocenie wieku osobnika [16].

Wole jest nieparzystym workiem, nazywanym również zbiornikiem pokarmu albo pęcherzem wola. Różni się od przelyku znacznie większą śred-

tum w terminalnym segmencie odwłoka [15]. Składa się z trzech morfologicznie i ontologicznie różnych części: jelita przedniego, środkowego i tylnego. W obrębie jelita przedniego przelyk bez wyraźnej granicy przechodzi w wole (łac. *ingluvies*, ang. *crop*), które wypełnione u larw III stadium jest dobrze widoczne nawet gołym okiem i tym samym łatwe do identyfikacji (ciemne pole wewnątrz larwy w jej przedniej części; ryc. 1.). Kolor i długość wola można wykorzystać przy ocenie wieku osobnika [16].

Wole jest nieparzystym workiem, nazywanym również zbiornikiem pokarmu albo pęcherzem wola. Różni się od przelyku znacznie większą śred-



Ryc. 1. Górny panel: Poglądowy szkic stadiów rozwojowych larw muchówek. A) I stadium larwalne; B) II stadium larwalne; C) III stadium larwalne (to właśnie w tym stadium można efektywnie wyizolować wole zawierające największą ilość niestrawionego ludzkiego DNA). Na rycinie nie zachowano dokładnych proporcji – istotny jest przyrost masy i długości larwy wraz z wiekiem. **Dolny panel:** Fotografia kłębowiska larw III stadium z wypełnionymi wolami, zaznaczonymi za pomocą białych strzałek (dzięki uprzejmości prof. dr. hab. Krzysztofa Szpili z Katedry Ekologii i Biogeografii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu)

Fig. 1. Upper panel: Illustrative representation of development stages of fly larvae. A) first larval stage; B) second larval stage; C) third larval stage (at this stage it is possible to successfully isolate crops containing the largest amount of undigested human DNA). The figure does not reflect accurate proportions: the focus is on the increase in weight and length of larvae along with age. **Lower panel:** Photograph of a group of third-instar larvae with filled crops, marked by white arrows (courtesy of Prof. Krzysztof Szpila, PhD (hab.), Chair of Ecology and Biogeography, Nicolaus Copernicus University in Toruń)

nicą. Jego umięśnienie u plujek (*Calliphoridae*) jest dobrze rozwinięte. Przewód zbiornika pokarmu leży w tej samej płaszczyźnie co początkowa część przełyku. Wessany przez muchówkę płynny pokarm dostaje się do wola, a stamtąd stopniowo przechodzi do jelita środkowego. W przypadku pobrania wraz z płynnym pokarmem większej ilości stałych cząstek pokarm może przechodzić dalej, omijając wole.

Prezerwacja larw i preparatyka wola

W tabeli I zebrano i podsumowano wybrane publikacje dotyczące analizy ludzkiego materiału genetycznego, wyizolowanego z larw owadów nekrofagicznych. Większość z nich ma charakter typowo poznawczy (badania laboratoryjne). Postacie dorosłe (imago) wybranych grup owadów, użytecznych w genetyce sądowej, przedstawiono na rycinie 2.

Najczęściej wybieranym do badań stadium rozwojowym było III (najstarsze) stadium larwalne, które cechuje m.in. największa długość larwy [17]. Czas, jaki musi upłynąć do osiągnięcia tego stadium, jest cechą gatunkową, np. dla *Calliphora vicina* wynosi 2,5–4,5 doby od momentu złożenia jaj w sprzyjających warunkach temperaturowych.

Po wybraniu aktywnie żerujących larw zaleca się ich uśmiercenie, przemycie w roztworze podchlorynu sodu i wodzie dejonizowanej [18]. Wykazano, że powszechnie stosowane uśmiercenie larw przez ich kilkusekundowe przelanie wrzątkiem, poprzedzające zamrożenie, nie wpływa na efekt profilowania DNA [14]. Po pozbyciu się nadmiaru wody, za pomocą sterylnej pęsety należy przenieść larwy do próbki i przechowywać do czasu analizy w temperaturze -20°C lub -70°C . Co ważne, larwy powinny być zamrażane bez pozostałości wody, która uszkadza wole, a tym samym obniża efektywność izolacji DNA.

Głównym źródłem treści pokarmowej larwy wykorzystywanej do analiz zawartego w niej ludzkiego materiału genetycznego jest opisane powyżej wole. Jest to miejsce przechowywania treści pokarmowej i generalnie nie są tam wydzielane enzymy trawienne. Organ ten nie jest jednak wolny od ich działania ze względu na przedostawanie się enzymów wraz ze śliną larwy, pochodzącą z gruczołów ślinowych, która nadtrawia pokarm [17]. Oczywiście, im dłuższy jest czas trawienia przez larwę spożytego pokar-

flies (*Calliphoridae*), the crop has a well-developed musculature. The duct of the food sac lies in the same plane as the initial section of the oesophagus. Liquid food sucked by flies enters the crop, from which it gradually passes into the midgut. Whenever ingested liquid food contains a larger amount of solid particles, the food can pass further, bypassing the crop.

Preservation of larvae and preparation of the crop

Table I lists and summarizes selected publications discussing the analysis of human genetic material isolated from necrophagous insect larvae. The majority of them are typically cognitive in character (laboratory tests). Adult stages (imago) of selected groups of insects which are useful in forensic genetics are presented in Fig. 2.

The most commonly investigated development stage was the third (oldest) larval stage which is characterized, among other features, by the largest length of larvae [17]. The time that elapses until the stage is achieved is species-specific – for example, for *Calliphora vicina* it is 2.5–4.5 days from the moment of egg-laying in favourable temperature conditions.

After selecting actively feeding larvae, they should be killed, washed in sodium hypochlorite solution and deionized water [18]. The common practice of killing larvae by placing them for several seconds in boiling water and then freezing has not been shown to influence the effect of DNA profiling [14]. After removing excess water, larvae should be transferred into a test tube using sterile tweezers, and stored until the time of analysis at a temperature of -20°C or -70°C . Importantly, larvae should be frozen without residual water because it damages the crop and therefore reduces the effectiveness of DNA isolation.

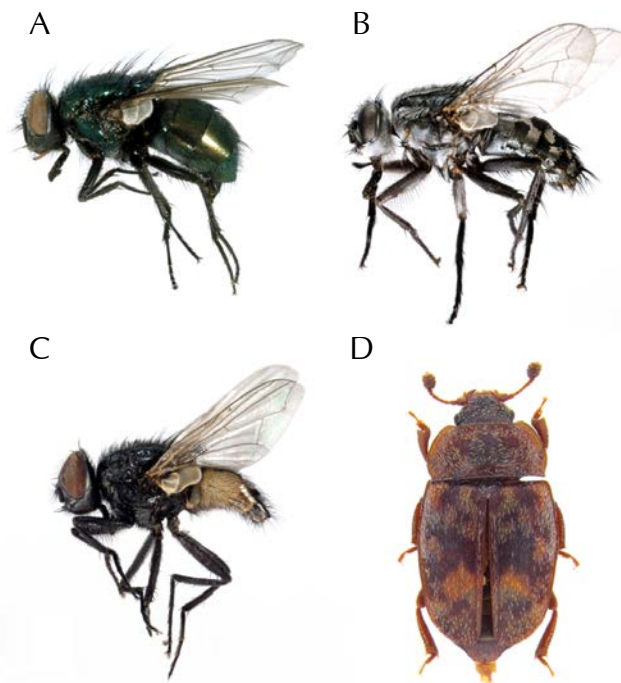
The crop, as described above, is the main source of food content collected from larvae for performing analysis of contained human genetic material. It is where food content is stored and, generally, no digestive enzymes are secreted. However, the organ is not free from their activity because of the release of enzymes together with larval saliva originating in salivary glands, which is responsible for the preliminary digestion of food [17]. Naturally, the longer a larva digests ingested food, the lower the

Tabela 1. Podsumowanie doniesień dotyczących udanej izolacji i analizy ludzkiego DNA z materiału entomologicznego
Table 1. Summary of reports on the successful isolation and analysis of human DNA from entomological material

Liczba osobników Number of specimens	Rozmiar wola Carp size	Gatunek Species	Kraj Country	Wiek Age	Prezerwacja Preservation	Zestaw/metoda izolacji Isolation kit/method	Analiza STR STR analysis	Analiza mtDNA mtDNA analysis	Piśmiennictwo References
8–10	2–5 mm	<i>Calliphora vicina</i>	Włochy Italy	III stadium larwalne third larval stage	na sucho w –20°C dry, at –20°C	Qiagen™ DNA MicroKit, DNA IQ™ (Promega), Chelex™ (Biorad)	AmpFISTR Identifier™ 15/15 + Y-filer™ 16/16	nie badano not studied	[21]
5	ok. 3 mm ca. 3 mm	<i>Cynomyopsis cadaverina</i>	USA	III stadium larwalne third larval stage	70-procentowy roztwór etanolu w –20°C 70% ethanol solution at –20°C	QIAamp®	nie badano not studied	uzyskano fragment HVII 3/5 fragment was obtained	[11]
5	–			dorośle (imago) adult (imago)				nie uzyskano not obtained	
3	–	<i>Calliphoridae, Sarcophagidae</i>	Meksyk Mexico	–	70-procentowy roztwór etanolu w 4°C 70% ethanol solution at 4°C	ekstrakcja fenolowo-chloroformowa phenol-chloroform extraction	Identifier 13/16	nie badano not studied	[44]
nie podano not specified	nie podano (długość larw 1,1–1,6 cm) not specified (length of larvae: 1.1–1.6 cm)	<i>Aldrichina grahami</i>	Chiny China	III stadium larwalne third larval stage	na sucho w –70°C dry, at –70°C	–	Identifier 16/16	uzyskano fragment HVII fragment was obtained	[14]
nie podano not specified	nie podano (długość larw 1,1–1,5 cm) not specified (length of larvae: 1.1–1.5 cm)	<i>Aldrichina grahami</i>	Chiny China	III stadium larwalne third larval stage	–	QIAamp®	Identifier 16/16	nie badano not studied	[45]

Tabela I. Cd.
Table I. Cont.

Liczba osobników Number of specimens	Rozmiar wola Crop size	Gatunek Species	Kraj Country	Wiek Age	Prezerwacja Preservation	Zestaw/metoda izolacji Isolation kit/method	Analiza STR STR analysis	Analiza mtDNA mtDNA analysis	Piśmiennictwo References
1	–	<i>Lucilia sericata</i>	Włochy Italy	puparium	na sucho w –20°C dry, at –20°C	Chelex-100 (Bio-Rad)	AmpF/STR NGMTM Select 0/17	nie badano not studied	[22]
3	–					PrepFiler kit (Applied Biosystem)	AmpF/STR NGMTM Select 17/17	nie badano not studied	
8	–	<i>Lucilia sericata</i>	Turcja Turkey	III stadium larwalne third larval stage	na sucho w –20°C dry, at –20°C	Qiagen™ DNA MniKit	Identifiler 3 x (16/16), 3 x niekompletne, 2 x (0/16) Identifiler 3 x (16/16), 3 x incomplete, 2 x (0/16)	nie badano not studied	[24]
1–4	1–3 mm	<i>Calliphoridae</i> , <i>Sarcophagidae</i> , <i>Muscidae</i>	Niemcy Germany	III stadium larwalne third larval stage	70-procentowy roztwór etanolu, brak informacji o temperaturze 70% solution of ethanol, no information about temperature	ekstrakcja fenolowo-chloroformowa phenol-chloroform extraction	Profiler Plus 7 x (10/10), 2 x niekompletne (< 10), 4 x (0/10) Profiler Plus 7 x (10/10), 2 x incomplete (< 10), 4 x (0/10)	uzyskano fragmenty HVI i HVII 12/13 HVI and HVII 12/13 fragments were obtained	[10]



Ryc. 2. Przedstawiciele wybranych grup owadów użytecznych w genetyce sądowej: postać dorosła (imago) muchówki z rodziny *Calliphoridae* (A), *Sarcophagidae* (B), *Muscidae* (C) (dzięki uprzejmości prof. dr. hab. Krzysztofa Szpili i dr. Andrzeja Grzywacza z Katedry Ekologii i Biogeografii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu); postać dorosła (imago) chrząszcza z rodzaju *Omosita* (D) (dzięki uprzejmości mgr Anny Mądraj i dr. hab. Szymona Matuszewskiego z Pracowni Kryminalistyki Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu)

Fig. 2. Representatives of selected groups of insects which are valuable for forensic genetics: adult form (imago) of a fly from the families *Calliphoridae* (A), *Sarcophagidae* (B) and *Muscidae* (C) (courtesy of Prof. Krzysztof Szpila, PhD (hab.) and Andrzej Grzywacz, PhD, Chair of Ecology and Biogeography, Nicolaus Copernicus University in Toruń); adult form (imago) of a beetle from the genus *Omosita* (D) (courtesy of Anna Mądra, MA, and Szymon Matuszewski, PhD (hab.), Department of Criminalistics, Adam Mickiewicz University in Poznań)

mu, tym mniejsze prawdopodobieństwo uzyskania optymalnego wyniku analizy genetycznej. Na tempo trawienia wpływa m.in. temperatura, która reguluje aktywność enzymów – zasadniczo im niższa, tym dłuższe trawienie [13].

Dynamika opróżniania woli jest cechą gatunkową. Może przebiegać gwałtownie, jak u *Phaenicia sericata* czy *Calliphora vicina*, lub stopniowo – jak u *Chrysomya rufifacies*. Ze względu na fakt opróżniania woli po 24–48 godzinach od ostatniego posiłku, które powoduje obkurczenie tej struktury do długości ok. 1 mm, larwy ujawnione na zwłokach należy jak najszybciej poddać preparatyce lub procedurze przechowywania w niskiej temperaturze [17]. Długość woli izolowanych z larw III stadium najczęściej mieści się w zakresie 2–5 mm. Odseparowanie woli od reszty przewodu pokarmowego przeprowadza się za pomocą sterylnych mikronożyczek lub innych narzędzi

likelihood of obtaining an optimum result of genetic analysis. One of the factors affecting the rate of digestion is temperature which regulates enzymatic activity. Generally, the lower the temperature, the longer the digestion [13].

The dynamics of crop emptying is a species-specific feature. It can occur very rapidly, as in *Phaenicia sericata* or *Calliphora vicina*, or gradually – as in *Chrysomya rufifacies*. Since the crop is emptied within 24-48 hours after the last intake of food, following which the structure shrinks to a length of ca. 1 mm, larvae detected on a corpse must be subjected to a preparation procedure as soon as possible or stored at a low temperature [17]. The typical length of crops isolated from third-instar larvae ranges from 2 to 5 mm. The crop can be separated from the remaining part of the alimentary canal with sterile microscissors or other surgical tools under magnifi-

chirurgicznych pod kontrolą oka uzbrojonego (optymalnie w mikroskopie stereoskopowym). Dotychczas nie ustalono ostatecznie, przez jaki okres możliwa jest efektywna izolacja ludzkiego DNA z woli larw po ich odstawieniu od źródła pokarmu [10, 17]. Wykazano, że jest to możliwe dla mtDNA po 24 godzinach, natomiast po 48 godzinach – nie ma takiej możliwości zarówno dla mitochondrialnego, jak i genomowego DNA [17, 19, 20].

Kluczowym czynnikiem warunkującym możliwość efektywnej izolacji ludzkiego DNA z przewodu pokarmowego larw wydaje się temperatura ich przechowywania – optymalnie -70°C . W momencie zabezpieczania larw nie powinno się stosować tej samej techniki utrwalania dla celów oceny morfologicznej i badań z zakresu biologii molekularnej [12]. Wśród najpowszechniej stosowanych utrwalaaczy materiału entomologicznego znajduje się wysokoprocenowy (70–80%) roztwór etanolu i choć spełnia swoją funkcję, jeśli chodzi o późniejszą ocenę morfologii, to może obniżyć efektywność izolacji DNA i uzyskania pełnego profilu *loci* autosomalnych, podobnie jak roztwory zawierające formalinę [17, 21]. Należy zaznaczyć, że przechowywanie larw w dodatnich temperaturach w etanolu daje zdecydowanie lepsze rezultaty niż przechowywanie próbek w roztworach formaliny lub na sucho [12]. Zehner i wsp., mimo stosowania etanolu w procedurze przechowywania larw, uzyskali pełny profil krótkich powtórzeń tandemowych (STR). Zastosowali oni jednak wydłużenie liczby cykli reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) z 29 do 32 [10]. Przechowywanie larw w temperaturze pokojowej w wysokoprocenowym roztworze etanolu może powodować dodatkowe trudności wizualne w odróżnieniu i izolowaniu woli z układu pokarmowego tychże larw [17, 21].

Isolacja i analiza ludzkiego DNA z różnych rodzajów śladów entomologicznych

Sama procedura izolacji DNA z wyizolowanego wcześniej wola nie różni się od standardowej. Wśród dostępnych komercyjnie zestawów do izolacji DNA (Qiagen™ DNA MicroKit, DNA IQ™ i Chelex™) najlepsze rezultaty uzyskano przy użyciu zestawu firmy Qiagen [21]. Badania z zastosowaniem odczynnika Chelex-100 (Bio-Rad) oraz zestawu PrepFiler Kit (Applied Biosystem) wykazały, że uzyskanie pro-

cedure (optimally using a stereoscopic microscope). The length of the period during which effective isolation of human DNA from crops is possible after the separation of larvae from a source of food has not, as yet, been definitely established [10, 17]. It has been shown that the procedure is possible for mtDNA after 24 hours, however after 48 hours there is no longer such possibility either for mitochondrial or genomic DNA [17, 19, 20].

The key factor determining the possibility of effective isolation of human DNA from the larval alimentary canal seems to be the temperature of storage of larvae – the optimum temperature is -70°C . The securing of larvae should not be performed with the same fixing technique for morphological assessment and molecular biological tests [12]. One of the most commonly used fixing agents for entomological material is a highly concentrated (70–80%) solution of ethyl alcohol. Although the agent serves its function in terms of the later assessment of morphology, it can reduce the effectiveness of DNA isolation and the acquisition of a full profile of autosomal *loci*, similarly to formalin-containing solutions [17, 21]. However, it must be noted that the storage of larvae at above-zero temperatures in ethanol gives decidedly better results than storing samples in formalin solutions or in dry storage conditions [12]. Zehner *et al.* acquired a full short tandem repeat (STR) profile despite using ethanol in their procedure of storing larvae, however they increased the number of polymerase chain reaction (PCR) cycles from 29 to 32 [10]. Storing larvae at room temperature in a highly concentrated solution of ethyl alcohol can cause additional visual difficulties with the differentiation and isolation of crops from the larval alimentary canals [17, 21].

Isolation and analysis of human DNA from various types of entomological evidence

The method of DNA isolation from a previously isolated crop is no different from the standard procedure. Out of all commercially available DNA isolation kits (Qiagen™ DNA MicroKit, DNA IQ™ and Chelex™), the best results have been obtained using the Qiagen kit [21]. Studies using the Chelex-100 reagent (Bio-Rad) and the PrepFiler Kit (Applied Biosystem) have shown the latter to

filu STR było możliwe przy wykorzystaniu drugiego z nich [22]. Niestety, brak w literaturze fachowej badań porównujących efektywność szerokiego spektrum dostępnych obecnie komercyjnych zestawów w izolacji ludzkiego DNA z larw. W sytuacji uzyskania jedynie częściowych profili STR słuszne wydaje się stosowanie zestawów do oceny polimorfizmu SNP dających lepsze rezultaty w przypadku zdegradowanego enzymatycznie DNA [23, 24].

Należy pamiętać, że nie wszystkie larwy nadają się do izolacji ludzkiego DNA wg opisanej wyżej procedury. Przykładem mogą być larwy ujawniane w jamie szpikowej kości, najczęściej o niewielkich rozmiarach i bez wyraźnie widocznych woli (ryc. 3.). Rozwiązaniem w tej sytuacji może być wykorzystanie całych okazów, choć wiadomo, że lepsze efekty daje selektywna preparatyka woli [12, 13].

Większość dotychczas opublikowanych prac dotyczy analizy genomowego DNA, jednak coraz więcej doniesień przedstawia także analizę mitochondrialnego DNA wyizolowanego ze śladów entomologicznych [17]. Efektywna analiza mtDNA jest bardziej prawdopodobna niż genomowego, co wynika z większej ilości mtDNA w komórce. Analizie poddaje się sekwencje hiperzmiennych regionów (HVR): HVI i HVII. Zespołowi Wells i wsp. sekwencje te udało

successfully yield a STR profile [22]. Unfortunately, the existing literature on the topic does not include studies comparing the effectiveness of the broad spectrum of currently available commercial kits in the isolation of human DNA from larvae. In the context of obtaining only partial STR profiles, it seems justified to use SNP assessment kits which produce better results in analyses of enzymatically degraded DNA [23, 24].

It must also be remembered that not all larvae are suitable for human DNA isolation according to the procedure outlined above, including, for example, larvae detected in the bone marrow cavity, which are usually small in size and do not have distinctly visible crops (Fig. 3). In such situations, whole specimens can be used, however selective preparation of crops is known to produce better results [12, 13].

Most publications to date focus on the analysis of genomic DNA, however there is also a growing body of reports addressing the analysis of mitochondrial DNA isolated from entomological evidence [17]. The probability of performing an effective analysis is greater for mtDNA than for genomic DNA, which is an effect of a larger amount of mtDNA in cells. The analysis comprises HVR (hypervariable region)



Ryc. 3. Larwy w jamie szpikowej kości nadesłanej do badań genetycznych – identyfikacyjnych
Fig. 3. Larvae found in the marrow cavity of a bone sent for genetic identification tests

się oznaczyć w 3/5 przypadków materiału biologicznego wyizolowanego z larw, natomiast nie udało się ich oznaczyć w materiale wyizolowanym z osobników dorosłych [11]. Praca DiZinno i wsp. wykazała, że analiza mtDNA wyizolowanego z larw chrząszczy z rodzaju *Omosita* (*Coleoptera: Nitidulidae*), żerujących na ludzkiej kości (żebrze), pozwala na identyfikację osobniczą zwłok o nieustalonej tożsamości [25]. Autorzy taką samą metodą przebadali materiał entomologiczny, materiał kostny i krew ze zwłok – wyniki były identyczne.

Warto zauważyć, że chociaż większość prac koncentruje się na larwach III stadium, istnieją również doniesienia o efektywnej izolacji DNA kręgowców (owcy) z dwudniowych poczwarek *Calliphora dubia* oraz izolacji ludzkiego DNA z kokonów (łac. *puparium*) poczwarek *Lucilia sericata* [22, 26, 27]. Ten fakt sugeruje, że niestrawiona zawartość woli u larw po stadium aktywnego żerowania (*third instar post-feeding larvae*) może wchodzić w skład tworzącego się *puparium*. *Puparia* są stabilnymi strukturami, znajdowanymi jeszcze długo po okresie aktywnego żerowania form III stadium larwalnego. Efektywna izolacja ludzkiego DNA z tego źródła za pomocą zestawu PrepFiler (Applied Biosystem) wydaje się więc mniej zależna od funkcji czasu [22]. Nadal jednak nie wiadomo, gdzie dokładnie zlokalizowane jest ludzkie DNA w strukturze *puparium*.

W praktyce genetyczno-sądowej warto pamiętać, że owady żerujące na zwłokach i owady krwiopijne (np. komary) mogą przypadkowo przenosić na lub w swoim ciele krew i płyny gnilne w miejscu przestępstwa, tworząc różnego rodzaju artefakty. Mogą również tworzyć je na skutek zwrócenia spożytego pokarmu (krwi, płynu gnilnego, tkanek miękkich) lub jego wydalania. Jest to więc materiał potencjalnie zawierający ludzkie DNA, możliwe do ekstrakcji i analizy [28]. Dobrym przykładem może być przypadek analizy genetycznej plamy krwawej, która powstała na skutek rozgniecenia komara, ujawnionej w mieszkaniu podejrzanego o morderstwo. Uzyskany z plamy profil DNA odpowiadał w pełni profilowi ofiary, której włókno znajdowały się w znacznym oddaleniu od mieszkania podejrzanego [29].

Niemieccy badacze przeprowadzili wiele doświadczeń z wykorzystaniem zwierzęcej krwi i much *Calliphora vicina*. Analiza „artefaktów” pozostawionych przez owady z wykorzystaniem mar-

sequences: HVI and HVII. Wells *et al.* have successfully analyzed the sequences in three fifths of cases of biological material isolated from larvae, however failed to determine them in material isolated from adult specimens [11]. A study by DiZinno *et al.* has demonstrated that the analysis of mtDNA isolated from larvae of beetles of the genus *Omosita* (*Coleoptera: Nitidulidae*) feeding on a human bone (a rib) allows for personal identification of unidentified corpses [25]. The authors applied the same method for examining entomological material, bone material and blood recovered from the human remains, obtaining identical results.

It should also be noted that even though the majority of studies concentrate on third-instar larvae, there are also reports about successful isolation of the DNA of vertebrates (sheep) from two-day-old pupae of *Calliphora dubia* and isolation of human DNA from the *puparia* of *Lucilia sericata* pupae [22, 26, 27]. This finding suggests that in third-instar post-feeding larvae the undigested content of crops can be a component involved in the process of *puparium* formation. *Puparia* are stable structures which are normally found long after the period of active feeding of third-instar larvae. An effective isolation of human DNA from this source using the PrepFiler kit (Applied Biosystem) thus seems to be less time-dependent [22]. However, the precise location of human DNA in the *puparium* structure is still unknown.

In forensic genetic practice, it is worthwhile to remember that insects feeding on corpses and haematophagous insects (e.g. mosquitoes) can accidentally carry blood and putrid fluids in/on their bodies on the crime scene, creating artifacts of various kinds. They can also produce them by vomiting previously ingested food (blood, putrid fluid, soft tissues) or excreting it. It follows that such material potentially contains human DNA that can be extracted and analyzed [28]. A good example can be the case of genetic analysis of a blood stain resulting from squashing a mosquito which was detected in the apartment of a murder suspect. The DNA profile derived from the stain was a full match to the DNA profile of the victim whose body was found at a considerable distance from the suspect's apartment [29].

German researchers have conducted a number of experiments with animal blood and *Calliphora*

kerów STR opracowanych dla świni domowej wykazała, że ekstrakcja i profilowanie DNA jest możliwe nawet po 4 miesiącach przechowywania tego typu śladów [30]. Badania odchodów much żywionych wcześniej krwią bądź nasieniem ludzkim również wykazały, że mogą one stanowić źródło ludzkiego DNA. Pełny profil STR z odchodów much żywionych krwią uzyskano w 35%, natomiast z odchodów much żywionych nasieniem ludzkim – w 88% wszystkich przeprowadzonych prób. Wykazano, że z zebranych 50 punktowych wydaliny (odchodów) można efektywnie wyizolować ludzkie DNA. Badania te prowadzono na gatunku *Lucilia cuprina*. Warto zauważyć, że efektywność izolacji była znacząco wyższa po 2 miesiącach przechowywania wymazu z odchodami w temperaturze pokojowej w stosunku do próbek krócej przechowywanych. Jak sugerują autorzy, może to wynikać ze składników wydaliny muchy, które interferują z komponentami zestawów do izolacji DNA, zmniejszając tym samym jego końcowe stężenie [31, 32].

Jak już wspomniano, oprócz larw muchówek, źródłem ludzkiego DNA mogą być także inne owady, np. owady hematofagiczne (krwiopijne): komary [29, 33–37], wszy [28, 38–40] oraz pluskwy domowe [41]. Badania przeprowadzone na komarach przez Curic i wsp. wykazały, że ustalenie ludzkiego profilu 15 *loci* STR jest możliwe nawet do 88 godzin po ukąszeniu [42]. Sam bierny kontakt owadów synantropijnych z kurzem, np. w mieszkaniu, wystarczy, aby mogły stanowić one źródło tzw. środowiskowego ludzkiego DNA, możliwe do wykorzystania w analizie genetyczno-sądowej pod kątem aktywności konkretnych osób w danym miejscu [43].

Wykorzystanie śladów entomologicznych jako źródła ludzkiego DNA w praktyce

Wykorzystanie materiału entomologicznego jako alternatywnego źródła ludzkiego DNA do badań genetyczno-sądowych w sprawach kryminalnych jest jeszcze mało powszechne, co z pewnością częściowo wynika z niewiedzy zarówno organów zlecających badania, jak i samych biegłych. Pierwszy opis przypadku zastosowania takiego podejścia (a zarazem wykorzystania entomologii sądowej w Meksyku) opublikowano dopiero w 2013 r. [44]. W opisanym sprawie wykorzystano zawartość prze-

vicina flies. An analysis of artifacts left by insects using STR markers dedicated to domestic pig has revealed that DNA extraction and profiling are possible even after four months of storage of this type of evidence [30]. Studies of faeces excreted by flies previously fed with human blood or semen have shown that they can also be used as a source of human DNA. A full STR profile has been obtained from the faeces of flies fed with blood and human semen in 35% and 88% of all samples, respectively. The study has demonstrated that human DNA can be successfully isolated from 50 collected spots of excreta (faeces). The analysis was conducted on the species *Lucilia cuprina*. It is noteworthy that the effectiveness of DNA isolation was significantly higher for the slide sample of faeces that had been stored at room temperature for two months than for the samples with shorter storage periods. As the authors suggest, this finding can be linked to the components of fly excreta which interfere with the constituents of DNA isolation kits, thus reducing its final concentration [31, 32].

As already mentioned, in addition to fly larvae, human DNA can also be extracted from other insects, e.g. haematophagous (blood-feeding) insects: mosquitoes [29, 33–37], lice [28, 38–40] and bed bugs [41]. Studies conducted on mosquitoes by Curic *et al.* have established that it is possible to determine the human profile of 15 STR *loci* for up to 88 hours after biting [42]. The passive contact of synanthropic insects with dust alone, for example in an apartment, is sufficient for the recovery of the so-called environmental human DNA which can be used in forensic genetic analysis to investigate the activity of specific people in a given location [43].

Use of entomological evidence as a source of human DNA in practice

The use of entomological material as an alternative source of human DNA for forensic genetic examinations in criminal cases is still not very widespread, partially due to the ignorance of institutions ordering forensic tests and forensic experts themselves. The first case report of such an approach (and, at the same time, the application of forensic entomology in Mexico) was only published in 2013 [44]. The case involved an analysis of the alimentary canal content of *Calliphoridae* and *Sarcophagi-*

wodu pokarmowego larw *Calliphoridae* i *Sarcophagidae* ujawnionych na spalonych włókach kobiety do ustalenia pokrewieństwa z domniemanym ojcem ofiary. Prawdopodobieństwo ojcostwa wyniosło 99,685%. Wyniki te były weryfikowane analizą DNA wyizolowanego z kości (wymagającą wielu prób, jak zaznaczyli autorzy), co pozwoliło na uzyskanie wyższej wartości prawdopodobieństwa [44].

Mimo pojawiających się czasem trudności, wykorzystanie larw muchówek i innych śladów entomologicznych jako alternatywnego źródła ludzkiego DNA dla celów identyfikacyjnych jest cennym uzupełnieniem klasycznych metod, możliwym do wykorzystania w szczególnych sytuacjach, zgodnie z oczekiwaniami organów ścigania i wymiaru sprawiedliwości.

Autorzy deklarują brak konfliktu interesów.

dae larvae detected on a burned female corpse. The aim of the analysis was to determine the biological relationship with the victim's alleged father. The likelihood of paternity was 99.685%. The results were verified by analyzing DNA isolated from bone (requiring multiple samples, as stressed by the authors), which made it possible to obtain a higher probability level [44].

Despite occasional difficulties, the method of identification based on fly larvae and other entomological evidence as an alternative source of human DNA is a valuable addition to classical identification methods, and can be employed in specific situations depending on the expectations of law enforcement agencies and the justice system.

The authors declare no conflict of interest.

Piśmiennictwo

References

1. Rogalla U. Fauna nekrofilna. *Genetyka + Prawo* 2012; 15: 11-13.
2. Amendt J, Campobasso CP, Lee Goff M, Grassberger M. *Current Concepts in Forensic Entomology*. Springer, Heidelberg 2010.
3. Rivers DB, Dahlem GA. *The Science of Forensic Entomology*. Wiley-Blackwell, Oxford 2014.
4. Gosselin M, Wille SM, Fernandez Mdel M, Di Fazio V, Samyn N, De Boeck G, Bourel B. Entomotoxicology, experimental set-up and interpretation for forensic toxicologists. *Forensic Sci Int* 2011; 208: 1-9.
5. 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.
6. Huchet JB, Greenberg B. Flies, Mochicas and burial practices: a case study from Huaca de la Luna, Peru. *J Archaeol Sci* 2010; 37: 2846-2856.
7. Wells JD, Stevens JR. Application of DNA-based methods in forensic entomology. *Annu Rev Entomol* 2008; 53: 103-120.
8. Chua TH, Chong YV. Role of Polymerase Chain Reaction in Forensic Entomology. In: *Polymerase Chain Reaction*. Hernandez-Rodriguez P (red.). InTech, Rijeka 2012; 51-64.
9. Introna F Jr, Wells JD, Di Vella G, et al. Human and other animal mtDNA analysis from maggots. *Proceedings of the 51th annual meeting, American Academy of Forensic Sciences (AAFS)*. Orlando 1999, p. 196, abstract G74, oral presentation.
10. 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.
11. Wells JD, Introna F Jr, Di Vella G, Campobasso CP, Hayes J, Sperling FA. Human and insect mitochondrial DNA analysis from maggots. *J Forensic Sci* 2001; 46: 685-687.
12. 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.
13. Li K, Ye G-Y, Zhu J-Y, Hu C. Detection of food source by PCR analysis of the gut contents of *Aldrinchina graham* (Aldrich) (Diptera: Calliphoridae) during post-feeding period. *Insect Science* 2007; 14: 47-52.
14. Li X, Cai JF, Guo YD, Xiong F, Zhang L, Feng H, Meng FM, Fu Y, Li JB, Chen YQ. Mitochondrial DNA and STR analyses for human DNA from maggots crop contents: a forensic entomology case from central-southern China. *Trop Biomed* 2011; 28: 333-338.
15. Draber-Mońko A. *Calliphoridae*. *Plujki (Insecta: Diptera)*. *Fauna Polski*. Vol. 23. Fundacja Natura Optima Dux, Warszawa 2004.
16. Greenberg B. Flies as forensic indicators. *J Med Entomol* 1991; 28: 565-577.
17. Campobasso CP, Linville JG, Wells JD, Introna F. Forensic genetic analysis of insect gut contents. *Am J Forensic Med Pathol* 2005; 26: 161-165.
18. Linville JG, Wells JD. Surface sterilization of a maggot using bleach does not interfere with mitochondrial DNA analysis of crop contents. *J Forensic Sci* 2002; 47: 1055-1059.



19. Linville JG, Campobasso CP, Hayes J, et al. Amplification of mitochondrial DNA and STR loci from maggot crop contents throughout the maggots development. W: The recovery and characterization of vertebrate DNA from forensically important fly larvae: an optimization study (dissertation). University of Alabama at Birmingham, Birmingham 2003.
20. Campobasso CP, Linville JG, Introna F. Potential forensic utility of genotyping human DNA from maggot gut contents: how long can a maggot be off the corpse and still be a useful source of human DNA? Proceedings of the First Meeting of the European Association for Forensic Entomology (EAFE), Frankfurt 2003; p. 27, abstract OC21, oral presentation.
21. Di Luise E, Magni P, Staiti N, Spitaleri S, Romano C. Genotyping of human nuclear DNA recovered from the gut of fly larvae. *Forensic Sci Int Genetics Supplement Series* 2008; 1: 591-592.
22. Marchetti D, Arena E, Boschi I, Vanin S. Human DNA extraction from empty puparia. *Forensic Sci Int* 2013; 229: e26-e29.
23. 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.
24. Kondakci GO, Bulbul O, Shahzad MS, Polat E, Cakan H, Altuncul H, Filoglu G. STR and SNP analysis of human DNA from *Lucilia sericata* larvae's gut contents. *Forensic Sci Int Genetics Supplement Series* 2009; 2: 178-179.
25. DiZinno JA, Lord WD, Collins-Morton MB, Wilson MR, Goff ML. Mitochondrial DNA sequencing of beetle larvae (Nitidulidae: Omosita) recovered from human bone. *J Forensic Sci* 2002; 47: 1337-1339.
26. Dadour IR, Roenterdink E, Carvalho FC. To determine the rate of fly development for more accurate postmortem intervals: to equip investigators with an array of tools using fly larvae. Proceedings of the XIX Congress of the International Academy of Legal Medicine (IALM). Milan 2003; p. 165, abstract OP109, oral presentation.
27. 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 Path* 2005; 1: 261-265.
28. Replogle J, Lord WD, Budowle B, Meinking TL, Taplin D. Identification of host DNA by amplified fragment length polymorphism (amp-flp) analysis: Preliminary analysis of human crab louse, *Pthirus pubis* (L.), excreta. *Med Vet Entomol* 1994; 31: 686-690.
29. Spitaleri S, Romano C, Di Luise E, Ginestra E, Saravo L. Genotyping of human DNA recovered from mosquitoes found on a crime scene. *International Congress Series* 2006; 1288: 574-576.
30. Kulstein G, Amendt J, Zehner R. Detection of porcine DNA derived from regurgitated and defecated artifacts of forensically important blowflies. 9th Meeting of the European Association for Forensic Entomology (EAFE), Toruń 18-21.04.2012; Congress Book: 33.
31. Durdle AR, Mitchell RJ, van Oorschot RAH. The change in human DNA content over time in the artefacts of the blowfly *Lucilia cuprina* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Sci Int Genetics Supplement Series* 2011; 3: 289-290.
32. Durdle A, van Oorschot RAH, Mitchella RJ. The transfer of human DNA by *Lucilia cuprina* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Sci Int Genetics Supplement Series* 2009; 2: 180-182.
33. Coulson RM, Curtis CF, Ready PD, Hill N, Smith DF. Amplification and analysis of human DNA present in mosquito blood meals. *Med Vet Entomol* 1990; 4: 357-366.
34. Gokool S, Curtis C, Smith D. Analysis of mosquito blood meals by DNA profiling. *Med Vet Entomol* 1993; 7: 208-215.
35. Chow-Shaffer E, Sina B, Hawley WA, De Benedictis J, Scott TW. Laboratory and field evaluation of polymerase chain reaction-based forensic DNA profiling for use in identification of human blood meal sources of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 2000; 37: 492-502.
36. Ansell J, Hu JT, Gilbert SC, Hamilton KA, Hill AV, Lindsay SW. Improved method for distinguishing the human source of mosquito blood meals between close family members. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; 94: 572-574.
37. Kreike J, Kampfer S. Isolation and characterization of human DNA from mosquitoes (Culicidae). *Int J Legal Med* 1999; 112: 380-382.
38. Lord WD, DiZinno JA, Wilson MR, Budowle B, Taplin D, Meinking TL. Isolation, amplification, and sequencing of human mitochondrial DNA obtained from human crab louse, *Pthirus pubis* (L.), blood meals. *J Forensic Sci* 1998; 43: 1097-1100.
39. Mumcuoglu KY, Gallili N, Reshef A, Brauner P, Grant H. Use of human lice in forensic entomology. *J Med Entomol* 2004; 41: 803-806.
40. Mukabana WR, Takken W, Seda P, Killeen GF, Hawley WA, Knols BG. Extent of digestion affects the success of amplifying human DNA from blood meal of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *Bulletin Entomological Research* 2002; 92: 233-239.
41. Szalanski AL, Austin JW, McKern JA, Steelman CD, Miller DM, Gold RE. Isolation and Characterization of Human DNA From Bed Bug, *Cimex lectularius* L., (Hemiptera: Cimicidae) Blood Meals. *J Agric Urban Entomol* 2006; 23: 189-194.
42. Curic G, Hercog R, Vrselja Z, Wagner J. Identification of person and quantification of human DNA recovered from mosquitoes (Culicidae). *Forensic Sci Int Genet* 2014; 8: 109-112.
43. Kester KM, Toothman MT, Brown BL, Street WS, Cruz TD. Recovery of environmental human DNA by insects. *J Forensic Sci* 2010; 55: 1543-1551.
44. de Lourdes Chávez-Briones M, Hernández-Cortés R, Díaz-Torres P, Niderhauser-García A, Ancer-Rodríguez J, Jaramillo-Rangel G, Ortega-Martínez M. Identification of human remains by DNA analysis of the gastrointestinal contents of fly larvae. *J Forensic Sci* 2013; 58: 248-250.



45. Yadong G, Jifeng C, Zhenchu T, Xiong F, Zhang L, Fu Y, Jianbo L, Yaoqing C, Fanming M, Jifang W. Application of *Aldrichina grahami* (Diptera, Calliphoridae) for forensic investigation in central-south China. *Rom J Leg Med* 2011; 19: 55-58.

Adres do korespondencji

Rafał Skowronek
Zakład Medycyny Sądowej i Toksykologii Sądowo-Lekarskiej
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
ul. Medyków 18
40-752 Katowice, Polska
e-mail: rafal-skowronek@wp.pl

Address for correspondence

Rafał Skowronek
Department of Forensic Medicine and Forensic Toxicology
Medical University of Silesia in Katowice
Medyków 18
40-752 Katowice, Poland
e-mail: rafal-skowronek@wp.pl