

GTFCCh-Workshop – Institut für Rechtsmedizin Mainz – 05.-06.10.2023

Forensische Entomotoxikologie

Jens Amendt und Lena Lutz

Institut für Rechtsmedizin, Forensische Biologie/Entomologie, Kennedyallee 104,
60596 Frankfurt am Main, amendt@em.uni-frankfurt.de

Insekten werden in den forensischen Wissenschaften und der Rechtsmedizin seit vielen Jahren als wichtige Spur erkannt und analysiert. Sie helfen vor allem bei der Eingrenzung des Todeszeitpunktes, indem man über die Altersbestimmung der sich an einem Leichnam entwickelnden Insekten und deren Artenzusammensetzung den Zeitraum bestimmt, den der Mensch mindestens schon tot ist. Neben dieser so genannten minimalen Leichenliegezeit können Insekten aber auch weitere Informationen liefern über z. B. den Tathergang oder postmortale Manipulationen [1].

Nekrophage Insekten können aber auch als toxikologische Proben Informationen über den Leichnam und seine Geschichte liefern, da sie während der Nahrungsaufnahme am menschlichen Körper Drogen und Toxine aufnehmen und eventuell auch anreichern. Vor allem bei längeren Leichenliegezeiten, wenn herkömmliche toxikologische Proben wie Weichteile, Blut und Urin für die Untersuchung nicht mehr zur Verfügung stehen, werden Insekten als alternative Matrix diskutiert, da sie und ihre Überreste Wochen, Monate oder sogar Jahre postmortal verbleiben.

Auch bei Insekten und deren toxikologischen Untersuchungen ist die geeignete Auswahl der Extraktions- und Analysetechniken wichtig. Sie hängt von den physikalischen und chemischen Eigenschaften der Droge/des Toxins ab [2]. Techniken wie Immunoassay, Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC/MS), Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (LC/MS), Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) und haben sich bewährt. Der Nachweis von Giftstoffen in den entomologischen Proben mit diesen Verfahren kann bei der Bestimmung der Todesursache helfen oder Informationen zur Identität des Leichnams liefern.

Die toxikologische Untersuchung entomologischer Proben hat aber auch andere Gründe – Drogen und Medikamente können Auswirkungen auf die Entwicklung der sie konsumierenden Insekten haben und so auch die entomologische Begutachtung von Todesfällen beeinträchtigen. Ein eventuell von der Norm abweichender Entwicklungsprozess könnte zu fehlerhaften Bestimmungen der minimalen Leichenliegezeit führen. Beide Aspekte, der Nachweis von Drogen und Medikamenten in Insekten und ein möglicher Einfluss auf deren Wachstum und weitere Entwicklung, stehen im Fokus der so genannten Entomotoxikologie.

Insbesondere Schmeißfliegen (Diptera: Calliphoridae) sind für entsprechende Analysen interessant, da sie den toten Körper sehr früh und zeitnah zum Todeszeitpunkt besiedeln und so eventuell auch Substanzen und deren Metabolite noch vor Abbau und Zerfall aufnehmen. Der Entwicklungszyklus dieser Insekten entspricht dem klassischen holometabolen Schema, bei dem über eine unterschiedliche Anzahl von Larvenstadien (bei Schmeißfliegen 3) ein Puppenstadium zur vollkommenen Umwandlung der Larve in das gänzlich anders aussehende adulte Stadium führt. Dieser Zyklus vom abgelegten Ei bis zum Schlüpfen der erwachsenen Fliege dauert in unseren Breiten im Mittel ca. 2-6 Wochen je nach Art und herrschender Umgebungstemperatur – Insekten sind wechselwarm, ihre Körpertemperatur und sämtliche Stoffwechselprozesse werden stark durch die Umgebungstemperatur gesteuert.

Insekten im Allgemeinen und Fliegenlarven im Besonderen akkumulieren im Laufe des skizzierten Entwicklungsschemas Xenobiotika. Dabei können sie teilweise eine bemerkenswerte

Toleranz gegenüber z. B. Barbituraten oder Morphin zeigen [3]. Sie wird durch die Hochregulierung von Enzymen wie Monoxygenase und Glutathiontransferase erreicht [3]. Die erste entomotoxikologische Studie wies Phenobarbital in Larven der Schmeißfliege *Cochliomyia macellaria* nach, die auf einem bereits skelettierten Leichnam gesammelt wurden [4]. Weitere in nekrophagen Insekten nachgewiesene Substanzen sind z. B. trizyklische Antidepressiva [5,6], Benzodiazepine [7,8], Methamphetamin [9], synthetische Cannabinoide [10] oder Kokain und Heroin [11,12]. Es ist nicht überraschend, dass die Aufnahme solcher Substanzen auch Einfluss auf die Insekten hat. Substanzen wie Phenobarbital verzögern z. B. die Entwicklung der Schmeißfliegen *Chrysomya albiceps* und *Chrysomya putoria* [13]. Methamphetamin verlangsamt bei der Schmeißfliege *Aldrichina grahami* ebenfalls die Entwicklungszeit bis zum Erreichen des Puppenstadiums [8]. Bestimmte Medikamente wie Benzodiazepine können aber auch ganz gegensätzliche Auswirkungen auf die Lebenszyklen der Insekten haben. Beispielsweise entwickeln sich die Larven der Schmeißfliege *Chrysomya albiceps* unter Einfluss dieser Medikamente schneller, während sich die Larven der Schmeißfliegen *Lucilia sericata* und *Lucilia silvarum* langsamer entwickeln [14]. Dies illustriert die potenzielle Komplexität der Interpretation entomotoxikologischer Befunde.

Das zeigt auch das Beispiel des Pestizids Terbufos – es beeinflusst die Aktivität und Mobilität von Larven der Schmeißfliege *Lucilia eximia* dosisabhängig [15]. Die Auswirkungen auf das Wachstum und die Entwicklung der Insekten variieren also offensichtlich je nach Wirkstoff, Dosis und Applikationsmodus sowie nach Zielart und Entwicklungsstadium. Es erscheint aus diesem Grund sinnvoll, bei fraglichen Intoxikationen bzw. dem Vorhandensein von Drogen im Körper des von Insekten befallenen Leichnams, zunächst den entsprechenden Nachweis in den Insekten zu führen. Bei einem positivem Befund wäre dann eine Entwicklungsstudie mit der fraglichen Insektenart auf entsprechend konzentriertem Nahrungssubstrat durchzuführen. Letzteres illustriert eine weitere Problematik der Entomotoxikologie: Inwieweit ist das Anreichern und Verfüttern der Droge in z. B. Schweinehackfleisch in einem kontrollierten Laborsetting ein sinnvolles entomotoxikologisches Surrogat für das von der Fliegenmade konsumierte Gewebe einer Person, die zu Lebzeiten z. B. regelmäßig Kokain konsumiert hat? Hier stellt sich die ethisch nicht einfach zu beantwortende Frage nach Tierversuchen, die eine natürliche Verstoffwechslung der Droge und das anschließende realistische Abbauen des Kadavers durch Fliegenmaden ermöglicht [16].

Bei aller Problematik und möglichen Auswirkungen der Substanzen auf das Wachstum der nekrophagen Insekten muss jedoch auch klar gesagt werden, dass das Ausmaß der Abweichungen von der Norm nicht überbewertet werden darf. Wenn z. B. Rezende et al. [13] feststellen, dass das Übersehen von Methylphenidat-Hydrochlorid in einem Leichnam zu einer Unterschätzung der Leichenliegezeit von 12 Stunden auf der Grundlage der Entwicklung der Schmeißfliege *Chrysomya putoria* führen kann, so ist die forensische Relevanz dieser Aussage gering: In der entomologischen Begutachtung werden in der Regel auf den Tag genaue Angaben zum Besiedlungszeitpunkt gemacht, d. h. ein „natürliches Rauschen“ von ± 12 h in Kauf genommen.

Es soll zum Abschluss nicht unerwähnt bleiben, dass der in den Insekten nachgewiesene Wirkstoff zumindest in den ersten Tagen und Wochen post mortem sehr oft auch in den Geweben der Leichen nachweisbar ist. Es ist bei Insekten, anders als bei den Analysen des Ausgangsgewebes vom menschlichen Leichnam, zudem schwierig bis unmöglich, eine quantitative Beziehung zwischen der Wirkstoffkonzentration im Verstorbenen und der Konzentration in den Insekten herzustellen. Diese lediglich qualitative Beziehung kann mit der heterogenen Verteilung der Maden auf dem Leichnam erklärt werden, ist aber auch auf die nur unzureichend bekannte und untersuchte Pharmakokinetik der Arzneimittel in den Insekten zurückzuführen [17]. Es ist in der Regel nicht bekannt, ob die aufgenommene Substanz verstoffwechselt, ausgeschieden oder assimiliert wird [18] und welche Stadien für toxikologische Untersuchungen relevant

sind. So wurde bei der Schmeißfliege *Calliphora vicina* vom Kombipräparat „Co-Proxamol“ zwar Dextropropoxyphen in Larven des letzten Larvenstadiums nachgewiesen, nicht aber Paracetamol, auch nicht in Puppen und geschlüpften Fliegen [19].

Während des Lebenszyklus` der Fliege müssen die Substanzen also nicht zwangsläufig bioakkumuliert, sondern können im Gegenteil komplett ausgeschieden werden [20]. Das bedeutet, dass die negativen toxikologischen Befunde der Drogen in auf Leichen asservierten Insektenstadien nicht ihre Abwesenheit in der Nahrungsquelle, d. h. dem toten Körper, belegen [20].

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass entomotoxikologische Studien sich immer stark an der Fallarbeit orientieren sollten, um tatsächlich relevante Ergebnisse bzgl. der Auswirkungen von Drogen und Medikamenten auf das Wachstum nekrophager Insekten zu erhalten. Inwieweit diese Insekten auch als Matrix zum (exklusiven) Nachweis von Fremdstoffen dienen können, bleibt abzuwarten.

Literatur

- [1] Amendt J, Richards CS, Campobasso CP, Zehner R, Hall MJ. (2011) Forensic entomology: applications and limitations. *Forensic Sci Med Pathol.*;7 (4):379-92.
- [2] Gosselin M, Wille SM, Fernandez MM, Di Fazio V, Samyn N, De Boeck G, Bourel B. (2011) Entomotoxicology, experimental set-up and interpretation for forensic toxicologists. *Forensic Sci Int.* 208 (1-3): 1-9.
- [3] Bushby SK, Thomas N, Priemel PA, Coulter CV, Rades T, Kieser JA. (2012) Determination of methylphenidate in Calliphorid larvae by liquid-liquid extraction and liquid chromatography mass spectrometry - forensic entomotoxicology using an in vivo rat brain model. *J Pharm Biomed Anal.* 70: 456-61
- [4] Beyer JC, Enos WF, Stajić M. (1980) Drug identification through analysis of maggots. *J Forensic Sci.* 25: 411-412.
- [5] Sadler DW, Richardson J, Haigh S, Bruce G, Pounder DJ. (1997) Amitriptyline accumulation and elimination in *Calliphora vicina* larvae. *Am J Forensic Med Pathol.* 18 (4): 397-403.
- [6] Campobasso CP, Gherardi M, Calligara M, Sironi L, Introna F. (2004) Drug analysis in blowfly larvae and in human tissues: a comparative study. *Int J Legal Med* 118: 210–214.
- [7] Sadler DW, Fuke C, Court F, Pounder DJ. (1995) Drug accumulation and elimination in *Calliphora vicina* larvae. *Forensic Sci Int.* 71 (3): 191-197.
- [8] Wang S, Zhang C, Chen W, Ren L, Ling J, Shang Y, Guo Y. (2020) Effects of Methamphetamine on the Development and its Determination in *Aldrichina grahami* (Diptera: Calliphoridae). *J Med Entomol.* 57 (3): 691-696.
- [9] Mullany C, Keller PA, Nugraha AS, Wallman JF. (2014) Effects of methamphetamine and its primary human metabolite, p-hydroxymethamphetamine, on the development of the Australian blowfly *Calliphora stygia*. *Forensic Sci Int.* 241: 102-111.
- [10] Groth O, Franz S, Fels H, Krueger J, Roider G, Dame T, Musshoff F, Graw M. (2022) Unexpected results found in larvae samples from two postmortem forensic cases. *Forensic Toxicol.* 40: 144-155.
- [11] de Carvalho LM, Linhares AX, Badan Palhares FA. (2012) The effect of cocaine on the development rate of immatures and adults of *Chrysomya albiceps* and *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae) and its importance to postmortem interval estimate. *Forensic Sci Int.* 220 (1-3): 27-32.
- [12] Wood T, Pyper K, Casali F. (2022) Effects of cocaine and heroin, and their combination, on the development rate of *Calliphora vomitoria* (Diptera: Calliphoridae). *Sci Justice.* 62 (4): 471-475.
- [13] Rezende F, Alonso MA, Souza CM, Thyssen PJ, Linhares AX. (2014) Developmental rates of immatures of three *Chrysomya* species (Diptera: Calliphoridae) under the effect of methylphenidate hydrochloride, phenobarbital, and methylphenidate hydrochloride associated with phenobarbital. *Parasitol Res.* 113: 1897-1907.
- [14] Boulkenafet F, Dob Y, Karroui R, Al-Khalifa M, Boumrah Y, Toumi M, Mashaly A. (2020) Detection of benzodiazepines in decomposing rabbit tissues and certain necrophagic dipteran species of forensic importance. *Saudi J Biol Sci.* 27 (7): 1691-1698.

- [15] Jales JT, Barbosa TM, Moreira VRF, Vasconcelos SD, de Paula Soares Rachetti V, Gama RA. (2023) Effects of Terbufos (Organophosphate) on larval behaviour of two forensically important Diptera species: Contributions for Entomotoxicology. *Neotrop Entomol.* 52 (6): 1155-1164.
- [16] Bourel B, Hédouin V, Martin-Bouyer L, Bécart A, Tournel G, Deveaux M, Gosset D. (1999) Effects of morphine in decomposing bodies on the development of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *J Forensic Sci.* 44 (2): 354-358.
- [17] Tracqui A, Keyser-Tracqui C, Kintz P, Ludes B. (2004) Entomotoxicology for the forensic toxicologist: much ado about nothing? *Int J Legal Med.* 118 (4): 194-196.
- [18] da Silva EIT, Wilhelmi B, Villet MH. (2017) Forensic entomotoxicology revisited-towards professional standardisation of study designs. *Int J Legal Med.* 131 (5): 1399-1412.
- [19] Wilson Z, Hubbard S, Pounder DJ. (1993) Drug analysis in fly larvae. *Am J Forensic Med Pathol.* 14 (2): 118-120.
- [20] Introna F, Campobasso CP, Goff ML. Entomotoxicology. *Forensic Sci Int.* 120 (1-2): 42-47.