

Медицински Университет “Проф. д-р Параскев Стоянов” Варна
Катедра по обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология
УНС по съдебна медицина и деонтология

Янко Георгиев Колев

**Приложение на *Diptera* при съдебно-
ентомологично определяне давността на
смъртта в България**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на научна и образователна
степен «доктор»

Научна специалност:

«Съдебна медицина», шифър 03.01.59

Научен ръководител: доц. д-р Добринка Д. Радойнова, дм

Официални рецензенти: доц. д-р Петко Ив. Лисаев, дм
доц. д-р Ирина Сл. Бурулянова, дм

Варна, 2012

Дисертационният труд съдържа 191 страници и е онагледен с 36 фигури, 5 таблици и 4 диаграми, приложения. Литературната справка съдържа 312 източника, от които 15 на кирилица.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на разширен катедрен съвет на Катедрата по обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология, Медицински университет «Проф. д-р Параскев Стоянов», Варна.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на от часа в Медицински Университет “Проф. д-р Параскев Стоянов” Варна, 3 етаж, Научен отдел. Материалите по защитата са на разположение в Научен отдел на Медицински Университет – Варна.

Съдържание

1. Увод
2. Цел и задачи на проучването
3. Материали и методи
4. Резултати
5. Обсъждане (дискусия)
6. Заключение с изводи
7. Приноси
8. Списък с оригинални публикации
9. Приложение
10. Summary (Резюме на английски език)
11. Благодарности

СЪКРАЩЕНИЯ

EAFE – Европейска Асоциация по Съдебна Ентомология

PMI – postmortem interval – постмортален интервал

ADD – accumulated degree days – акумулирани градус-дни

ADH – accumulated degree hours – акумулирани градус-часове

sp. – species – вид (класификационен)

UDT – upper development threshold – горен (температурен) праг на развитие

LDT – lower development threshold – долен праг на развитие, базова температура

PIA – period of insect activity – период на активност на насекомите

ДНК – дезоксирибонуклеинова киселина

1. Увод:

Съдебна ентомология (от гръцки ἔντομος, *entomos*, "това, което е изрязано в детайли или гравирано/сегментирано", тоест, "насекомо"; и -λογία, *-logos* „наука“) е наука, изучаваща насекомите и други членестоноги, свързани с разследвания на криминални престъпления, на нарушения на законите за храните, дивата природа и др.

Съдебномедицинската ентомология се занимава с изучаване на насекомите и използването на това познание при разследване на криминални престъпления. Това е интердисциплинарна наука, обединяваща методите на ентомологията, съдебната медицина, екологията, генетиката, токсикологията и др., с разработване на нови методи за съдебно-ентомологична експертиза. Тя изучава, анализира и систематизира биологични задачи, които възникват в процеса на разследване, а по съдържание решава възникващите в практиката научни проблеми.

Определянето на **давността на смъртта** е една от ключовите компетентности на съдебната медицина и един от най-значимите проблеми за решаване. Времето на настъпването на смъртта е много важно при фокусиране на разследването в определена времева рамка, характеризираща интервала преди смъртта и може да бъде ценен фактор за идентифициране на жертвата и престъпника.

Въпреки че през първите часове след смъртта съдебните лекари могат да осигурят мотивирано определяне на постморталния интервал, базирайки се на медицински параметри и на данни от местопроизшествието, тези методи стават все по-малко прецизни с напредване на времето. В сегашно време има няколко методики за определяне на постморталния интервал. Повечето от тях са базирани върху промените на трупа след смъртта. Тези промени могат общо да се нарекат постмортални промени. В ранния постмортален период (до 48-ия час след настъпване на смъртта), тези процеси включват трупни петна (*livores mortis*), послесмъртно изстиване (*algor mortis*), трупно вкочаняване (*rigor mortis*), автолиза и изсъхване. Факт е, че 48 часа след настъпване на смъртта, ентомологичните доказателства обикновено са най-точният и често единствен метод за определяне давността на смъртта.

В по-късния постмортален период, който започва приблизително след 48-ия час, животинският или човешкият труп преминава през поредица от декомпозиционни стадии, включващи:

- пресен,
- начално разложение,
- активно разложение,
- късно разложение,
- мумификация и скелетиране;

Тези стадии са лесно разпознаваеми, но границите помежду им са неотчетливи и значително се припокриват. Освен това, тяхното ниво на напредване може да се повлияе от редица фактори, включващи влажност, температура, присъствие или отсъствие на дрехи, погребване и дълбочината му.

Като резултат, точното определяне на началото и продължителността на тези стадии може да е значително затруднено, по този начин възпрепятствайки точното и прецизно определяне на давността на смъртта.

Насекомите са се усъвършенствали в процеса на еволюцията. Видовете, които използват трупите като хранителен субстрат, са си изработили особена чувствителност. По тази причина, още през първите минути и часове след настъпването на смъртта, се появяват насекоми, които започват да колонизират трупа и да влияят върху неговото състояние. Това дава основание те да се приемат като важен фактор при разследванията.

Съществуват **два основни подхода** при определянето на постморталния интервал с използване на насекоми като вещественно доказателство. Изборът на един от тях зависи в голяма степен от етапа на разложение (декомпозиция) на трупа в момента на откриването му. **Първият подход** включва анализ на начина на колонизация на трупа от последователни «вълни» от насекоми и други членестоноги. Всеки стадий на декомпозицията привлича различни видове. **Вторият подход** се базира върху установяването на стадия на развитие на **мухите (Двукрили - *Diptera*)**, които са били депозирани (във вид на яйца или ларви) върху трупа скоро след настъпване на смъртта. Темповете на развитие на трупните мухи са отчетливо зависими от условията на околната среда (сезон, климат, локализация) и най-вече – от околната температура. Това дава възможност да се изчисли с голяма точност времето на снасяне на яйцата им върху трупа, което обикновено е близко до момента на смъртта.

- **Ползата** от използването на насекомите за определяне на давността на смъртта е очевидна и доказана чрез множество изследвания, както и от практиката.
- Въпреки появяването на много видове насекоми върху трупа, някои от тях преобладават съществено, дори може да се твърди, че са единствени за даден **сезон и географска локализация**. Ларвите на тези видове конкурират всички останали при развитието си върху трупа. До пълно развитие и излюпване на зряло насекомо (муха) достига често само един вид (или два-три вида) за сезона и за дадения регион. Именно този вид е с най-голямо **значение** за съдебната медицина и за криминалното разследване, тъй като по неговото развитие може да се определя давността на смъртта. Останалите видове насекоми в съвкупност имат насочващо значение за приблизително определяне давността на смъртта и на пребиваването на трупа в определен регион.
- Важно е за всеки **географски регион** да има **изследване на местните видове** и популационните им особености, касаещи темповете на развитие. Само след такива изследвания резултатите може да се използват за съдебномедицинска експертиза и да имат юридическа стойност като точни данни, базирани на обективни факти.
- Международните изследвания и стандарти в съдебномедицинската ентомология потвърждават нуждата от национални източници за събиране на база данни относно видовете насекоми, колонизиращи труповете.
- Определянето на **основните видове насекоми (мухи), имащи съдебномедицинско значение** за определяне времето на настъпване на смъртта, ще улесни бъдещото практическо приложение.
- Разработването на опростена стандартна методика за събиране на ентомологични образци от местопроизшествието, ще даде възможност във всеки регион да се събират доказателства, годни за изследване и експертиза, въпреки липсата на специалисти.
- Очевидна е нуждата от сформиране на екип от няколко специалисти, които да отговарят на нуждата от такива експертизи в България.

2. Цели и задачи

В **настоящото проучване** се прави оценка на видовата композиция от насекоми, асоциирани с трупове в географския регион на България, както и влиянието на сезоните и моментните климатични условия върху състава на фауната от саркофаги; специфичните данни за особеностите на местните популации насекоми (предимно мухи) по отношение на използването им като индикатори за определяне давността на смъртта.

Целите на проучването са следните:

- Да се определят и идентифицират най-значимите от съдебномедицинска гледна точка видове насекоми - мухи, асоциирани със свински труп (модел на човешки труп) в региона на Габрово, България, за всеки сезон.
- Да се извърши събиране и изчисляване на точни данни за времето на развитие на ключови видове насекоми (мухи), при различна температура, с цел използването им при определяне давността на смъртта.
- Да се изготви прост и лесен за практическо приложение протокол за събиране на ентомологични доказателства от местопроизшествието.

Задачи на проучването:

1. Да се проведат експерименти през различни годишни сезони;
2. При извършването на експериментите да се събират, документират и изследват видовете насекоми, които се появяват по труповете и ги колонизират;
3. Да се документират и опишат следните параметри: промяна в температурата на околната среда и средната влажност; вътрешна температура на трупа, общи климатични промени; да се извърши фотозаснемане на експеримента;
4. Да се инкубират при контролирани условия ларвите на мухи, колонизиращи трупа, до стадий на зряло насекомо, подходящи за точна идентификация;
5. Да се извърши идентификация на видовете мухи, преминаващи пълен цикъл на развитие в труп, през различните сезони на експеримента;
6. Да се направи обработка на резултатите по възприети в съдебномедицинската ентомология методики;
7. Да се сравнят експерименталните данни с данни от изследвания в други географски региони;
8. Да се съпоставят експерименталните данни с данни от действителни случаи от практиката в региона;
9. Да се изготвят протоколи за събиране на ентомологични доказателства (съгласно Европейските стандарти на EAFE), които да се изпробват на практика.

3. Материали и методи

За определяне на постморталния интервал при разследвания на смърт се изискват базови данни за разпространението на най-значимите видове насекоми /т.нар. „индикатори“/. Известно е, че сезонната проява и видовото разнообразие варират в различните географски региони.

Място на проучването



Мястото на проучването бе избрано в крайградската зона на гр. Габрово (почти в географския център на България, предпланински район), върху частично засенчен от широколистна растителност склон на хълм. Участъкът е специално ограден преди експеримента, за да се предотврати случайна намеса на хора или животни. Мястото на поставяне на експерименталните животински трупове е подготвено чрез почистване на повърхността от трева и шума, за по-добра видимост. Размери на местата – приблизително 2,0 x 1,0 м за всеки свински труп, като всеки последователен експеримент е на най-малко 3 м от предишните.

Експериментални модели

Използването на човешки трупове за полеви проучвания не е разрешено от закона в България. Както е установено при други проучвания (Schoenly et al., 2007), по същество декомпозицията при свине е много подобна на човешката. Свински трупове са използвани при експериментите, защото са широко приети като човешки модели при такива проучвания. Свинете са подобни на хората, тъй като са всеядни и притежават подобна храносмилателна система, включително чревна фауна, която е важна при оценката на декомпозиционния процес на трупове. Последният стадий на храносмилането в чревния тракт и при хората, и при свинете, се осъществява чрез бактериално действие, а не чрез автолитично ензимно действие, както се случва при много други животни. Жлезите на дебелото черво секретират слюз (мукус), която

подготвя чревното съдържимо за елиминация чрез действията на бактериите. Тези бактерии ферментират всички останали въглехидрати и освобождават H_2S , CH_4 , и CO_2 . Съществуват разлики между типовете бактерии, намерени в чревния тракт на свинете и хората, но крайният резултат е продукцията на едни и същи газове в храносмилателната система. Свинете са относително безкосмести и имат кожна тъкан, подобна на човешката, в миналото дори използвана за човешки кожни графтове. Catts and Goff (1992) твърдят, че прасе с тегло около 23 кг е приблизително еквивалентно на торс на среднестатистически възрастен мъж, който всъщност заема основно място при декомпозицията и колонизацията от насекоми.

Материали и методика

Трупове на свине, *Sus scrofa L.*, са използвани като човешки модели в това проучване, по едно животно за всеки сезон (сезон на активност на насекомите). Средното тегло на животните е 20 - 32 кг. Всички мъртви прасета са закупени от близка до мястото ферма, като се избират здрави индивиди, без заболявания и специално третиране. Рано сутринта в деня на началото на всеки експеримент, непосредствено преди закупуването, прасетата се умъртвяват, чрез силен удар с твърд предмет в областта на главата. В резултат на този метод, настъпва почти мигновена смърт на животното, без загуба на вътрешни течности. Всяко мъртво прасе веднага се поставя в двоен здрав найлонов чувал (като тези, използвани при човешки трупове) и се транспортира до мястото на експеримента.

Върху трупа на мястото се поставя метална клетка (120 см дължина x 80 см ширина x 80 см височина), за да се предпази от големи хищни бозайници (кучета, чакали и др.). Клетките за експериментите са конструирани от здрава метална мрежа, върху дървена конструкция. Осигурени са чрез ластични въжета с куки, захванати за поне четири метални колчета, забити около клетката. Клетките се повдигат и поставят настрана по време на процедури за събиране на образци.

Инсталират се капани за насекоми на ниво повърхността на почвата, в четири точки на 1 метър разстояние от тялото, за които се използват вкопани до гърловината в земята стъклени буркани, запълнени до 1-2 см с вода, смесена с няколко капки детергент за намаляване на повърхностното напрежение.

Инструменти: Кутия-комплект

- протоколни листи за записване какви образци се събират, кога и къде;
- молив с тъмен графит или химикал с водоустойчиво и спиртоустойчиво мастило (не се препоръчва използването на обикновени мастила, тъй като те се разтварят от влагата или ако случайно се залееят с етанол);
- етикети (стикери);
- фини и средни пинсети (с различни нива на сила на защипване, за събиране на възрастни насекоми и по-крехките ларви);
- лъжица за събиране на ларви;
- фина четка за събиране на яйца (след овлажняване на четката);

- епруветки и контейнери с различни размери, за съхранение на живи и мъртви насекоми;
- дървени стърготини или фина хартия за съхранение на яйца и живи ларви в епруветки или контейнери;
- цифров термометър за измерване на телесна и околна температура, както и на температура на ларвените маси по време на събирането на образци;
- етанол (70 – 95 %) за съхраняване на мъртви образци;
- цифров фотоапарат/видеокамера за фотодокументация;
- ръчна мрежа за улов на летящи насекоми, ако е необходимо;
- термо- и хигродатчици за продължително измерване (програмируеми, със специализиран софтуер и адаптер за компютърен порт) iButton 1-Wire Thermochron DS1921G, DS1921H, Hygrochron DS1923 на Dallas Semiconductor, USA, за измерване на околна температура и влажност и за вътрешна температура на трупа по време на целия период на експеримента.

Събиране на данни с метеорологични замервания

Наблюденията и събирането на данни и образци се провежда ежедневно между 14,00 и 18,00 часа, когато мухите са най-активни, от деня на депозиране на трупа до първата вълна от ларви, напускащи тялото и превръщащи се в какавиди; последващи наблюдения и събиране на данни и образци през по-дълги интервали, до пълната декомпозиция на тялото (скелетиране). Ние събираме зрели насекоми около и по трупа и последващо образци от незрели стадии (яйца и ларви) от естествените отвори и рани (вторично причинени). Събираме също така насекоми изпод трупа и от почвата, както и от капаните, вкопани в почвата на четири места около тялото. Събраните зрели насекоми и някои от незрелите стадии се фиксират в 95% етанол и също така известно количество незрели стадии насекоми (ларви на мухи) се инкубират (отглеждат при контрол на температурата) до поява на възрастни насекоми, с цел таксономична идентификация. Датчиците за измерване на околната и трупната температура, ведно с влажността на въздуха, се използват за сравнение с локалните метеорологични данни, за бъдещо калкулиране на периодите на развитие на определени видове при вариращи температури. В допълнение, при всяко събиране на образци се измерва околната и вътрешна температура с цифров термометър.

Протокол за 1-ви ден

На първия ден за всеки сезонен експеримент, трупове на прасетата се изваждат от найлоновите чували и се поставят на определеното място. Тялото се поставя в средата под клетката, така че никоя телесна част да не се намира в близост до краищата ѝ. Прави се прободна рана в средата на корема на всяко животно, като по този начин се моделират реални условия на престъпление и се осигурява място за поставяне на вътрешен термодатчик – за измерване на телесната температура. Данните се събират и описват, включително номер на прасето (сезона), време на смъртта, дата, час, номер на образците, околна температура на ниво 1,5 м над земята и на ниво на почвата, вътрешна температура на трупа, влажност на въздуха, кратко описание на времето (слънчево, облачно, дъждовно, вятър и т.н.). Събирането на възрастни мухи се прави около, върху

и под трупа. Насекомите се поставят в контейнери, пълни с етанол и етикетирани. Яйцата на мухи се събират и поставят върху навлажнена хартия в контейнери за инкубиране. Част от яйцата се консервират чрез поставяне в етанол. Прави се фото- и видеозаснемане на прасето, насекомите и мястото.

Протокол за 2-ри ден и последващите дни

След първия ден образците се събират ежедневно през първите 40 дни за всеки експеримент и на всеки втори или трети ден през по-късния период (и по-дълъг интервал през студените есенни и зимни месеци). Отново се събират данни, включващи номер на прасето (сезон), дата, час, номер на образците, околна температура на ниво 1,5 м над земята и на ниво на почвата, вътрешна температура на трупа, влажност на въздуха, кратко описание на времето (слънчево, облачно, дъждовно, вятър и т.н.), активността на насекомите. Събират се зрели мухи и други насекоми (и техните ларви) над трупа, върху и под него, около него. Също така се събират образци от насекоми от почвата и от вкопаните капани в четири точки на 1 м от трупа. Образците се поставят в контейнери, пълни с етанол и етикетирани. Образци от живи ларви на мухи от трупа и изпод него се поставят в пластмасови контейнери (с фино перфорирани капачки) за инкубиране. Другата част от събраните ларви се умъртвяват по-късно, колкото е възможно по-скоро, чрез много гореща, но не вряла вода (над 80°C), за приблизително 30 секунди, за постигане на по-добра консервация и запазване на размерите. След това те се поставят в контейнери с етанол. Прави се фото- и видеозаснемане на прасето, насекомите и мястото.

Процедури по инкубиране (отглеждане)

Голяма част от ларвите на всеки образец се съхраняват в пластмасови контейнери при контролирани условия (известна температура – измервана чрез записващ термодатчик), на полици на територията на отделението по съдебна медицина в Габрово. Пластмасовите контейнери с фино перфорирани капачки позволяват циркулацията на въздух, но предпазват от излизане на ларвите. Постлани са с дървени стърготини или фина хартия, които абсорбират влагата, произвеждана от ларвите. Във всеки контейнер се поставя парченце смяно месо за хранене на ларвите. Ларвите се проверяват ежедневно. След поява на зрели мухи от какавидите, контейнерите се поставят във фризер за няколко минути, за да се умъртвят мухите. Възрастните насекоми се поставят в етикетирани контейнери с 95% етанол - за бъдеща идентификация. Събират се данни за температурата и времето на поява на зрели насекоми.

По време на събирането на образци от насекоми, при водене на документацията и процедурите, се спазват стандартите, определени от Европейската Асоциация за Съдебномедицинска Ентомология EAFE (Amendt J. et al., Int J Legal Med 2007). Използва се единен код за цялата документация. Този код ще послужи при бъдеща обработка на данните.



Всички събрани насекоми се идентифицират - лично след завършен високоспециализиран курс по идентификация на съдебномедицински значимите видове мухи и техните ларви (курс под егидата на EAFE, проведен в Университета “Николаус Коперник” в Торун – Полша, 2009), както и с помощта на колеги от Българската Академия на Науките (БАН) – Институт по зоология и експерти от чужбина – членове на EAFE.

Събиране на данни от действителни случаи в съдебномедицинската практика

През времето на провеждане на експерименталните проучвания със свински трупове, до настоящия момент се събират и данни от реални случаи в съдебномедицинската практика, в които е провеждано досъдебно производство (случаи на човешка смърт при неизяснени обстоятелства или съмнение за насилие). Събраните данни в част от случаите са били важни за самото разследване, а в други дават съществена информация за екологията на насекоми със съдебномедицинско значение. Събират се образци, съгласно стандартите в съдебната ентомология – както от местопроизшествието, така и в аутопсионната зала. Част от образците подлежат на инкубиране. Провежда се идентификация на събраните видове и се правят изводи за всеки отделен случай и в общ план. Тази допълнителна информация и данни за насекомите от реални случаи в практиката е важна както като обогатяване на знанията за местните видове трупни насекоми в България, така и като верификация на експерименталните данни.

Приложението на ентомологични методи за определяне времето на смъртта се състои от две основни процедури: 1. През ранния постмортален период това става чрез директно определяне на възрастта (стадия на развитие) на най-възрастните индивиди от ларви на мухи, които се са развили върху трупа (минимален постмортален интервал) (Marchenko, 2001). 2. По време на късния постмортален период, определянето се базира върху композицията от различни видове насекоми и членестоноги, по отношение и във връзка с очакваното съчетание от насекоми за определен стадий, специфични за даден географски регион (Méglin, 1894; Smith, 1986).

Международните институти по криминалистика вече имат уредени съдебномедицински ентомологични лаборатории, които съдействат на разследващите органи още на местопрестъплението. За съжаление в България и в Балканския регион няма подобни ресурси. Въвеждането в практиката на тези техники и методи е необичайно и няма теоретична и практическа основа до момента. Очевидна е нуждата от въвеждане на съдебномедицинската ентомология при разследване на смърт в нашия географски регион.

Това е първа стъпка за използване на стандартните съдебно-ентомологични методи, върху експериментален модел на колонизация на труп от насекоми в нашия регион. В резултат на растящия практически опит се изготви прост протокол за събиране на ентомологични доказателства от местопроизшествията. Протоколът трябва да съответства на Европейските стандарти за използване на съдебномедицинската ентомология при криминални разследвания и да отговаря на законовите процедури в България.

4. Резултати:

Проведени са общо четири експеримента и са събрани допълнително данни от реални случаи в практиката.

Извършени са наблюдения през две последователни години (2007 – 2008) за експериментите, в продължение на общо 402 дни. Събрани са образци в общо 561 контейнера с хиляди насекоми. Контейнерите с насекоми (не-мухи) се идентифицират в Института по зоология към БАН и не са предмет на настоящото изследване. Контейнерите с ларви на мухи и възрастни екземпляри на мухи (събрани на място и инкубирани в лаборатория в продължение на дни върху хранителна среда при контролирана температура, до излюпването им) се идентифицират лично. Като основа за идентификацията на мухите и ларвите им, се използват таксономични ключове от различни автори, но най-вече последните таксономични ключове на Krzysztof Szpila и Andrzej Grzywacz (Nicolaus Copernicus University, Institute of Ecology and Environmental Protection, Department of Animal Ecology), официално признати и използвани от Европейската Асоциация по Съдебномедицинска Ентомология (EAFE). При по-трудни моменти са правени консултации с колеги – съдебни ентомолози от асоциацията, най-вече с д-р Jens Amendt от Института по съдебна медицина в гр. Франкфурт на Майн - Германия – до 2010 година президент на асоциацията EAFE.

Авторът на този труд е завършил специализиран интензивен курс по идентификация на трупни мухи и ларвите им, при горещитираните специалисти, през м.април-май 2009 година.

Идентификацията се провежда на стереомикроскоп Leica EZ-4 при увеличения до x70, на всеки отделен екземпляр от събраните и запазени контейнери с мухи и техните ларви. Ключово внимание се отделя на мухите, излюпени на мястото на експеримента и на инкубираните в лаборатория мухи. За ларвите се прилага допълнително по-специфична техника, при която те предварително се обработват с р-р на КОН и се отпрепарират части от тях, за наблюдение повърхността на кутикулата им и челюстния им апарат с морфологичен микроскоп Leica DM-1000 при увеличение x400 и x1000. При мухите – набодени на ентомологични кърфици или фиксирани в етанол – наблюдават се стъпка по стъпка редица анатомични особености и в отделни случаи – специфика на половия апарат при мъжки и женски екземпляри.

Най-трудоемки и времеемки са многочасовото наблюдение и събиране на образци при разлагащите се трупове и детайлната идентификация на мухите, които са средно по 10 броя в контейнер.

Отделно време е отделено и за събиране, инкубация и идентификация на мухите от реални случаи в практиката.

I. Първи експеримент: пролетно експериментално изследване (2007 год.)

Пролетното експериментално изследване започна на 27.04.2007 г. и завърши на 09.07.2007 г. (дата на прекратяване на наблюдението и записи на състоянието). Общо наблюденията продължават седемдесет и четири (74) дни. Събрани са двеста и два (202) контейнера с насекоми за целия период, съдържащи няколко хиляди зрели индивиди и ларви на мухи (разред *Diptera*) и други видове членестоноги (разред *Coleoptera*, *Hymenoptera* и др.).



Трупът на прасето, с маса 32 кг, се разлага при тези атмосферни условия от прясно до скелетирано състояние (суха кожа и отделни кости) за период от около 35 дни, като през периода има валежи и захлаждания. На 3-тия ден започва видимо разложение с подуване и лек гнилостен мирис. Разложението е силно изразено към 6-ти – 7-ми ден, с промени в цвета и свличане на епидермиса, значителен гнилостен мирис. Към 9-ти – 10-ти ден има признаци на изсъхване на краищата на ушите, муцуната и копитата, гнилостна венозна подкожна мрежа. Коремното нараняване по-късно се заселва от ларви, защото червата тампонираят отвора. Към 12-ти – 13-ти ден обемът на меките тъкани на главата и силно редуциран. Към 14-ти – 15-ти ден намалява обемът и на корема. Към 20-тия ден целият труп е силно намален по обем. Постепенно се променят и мастните тъкани.

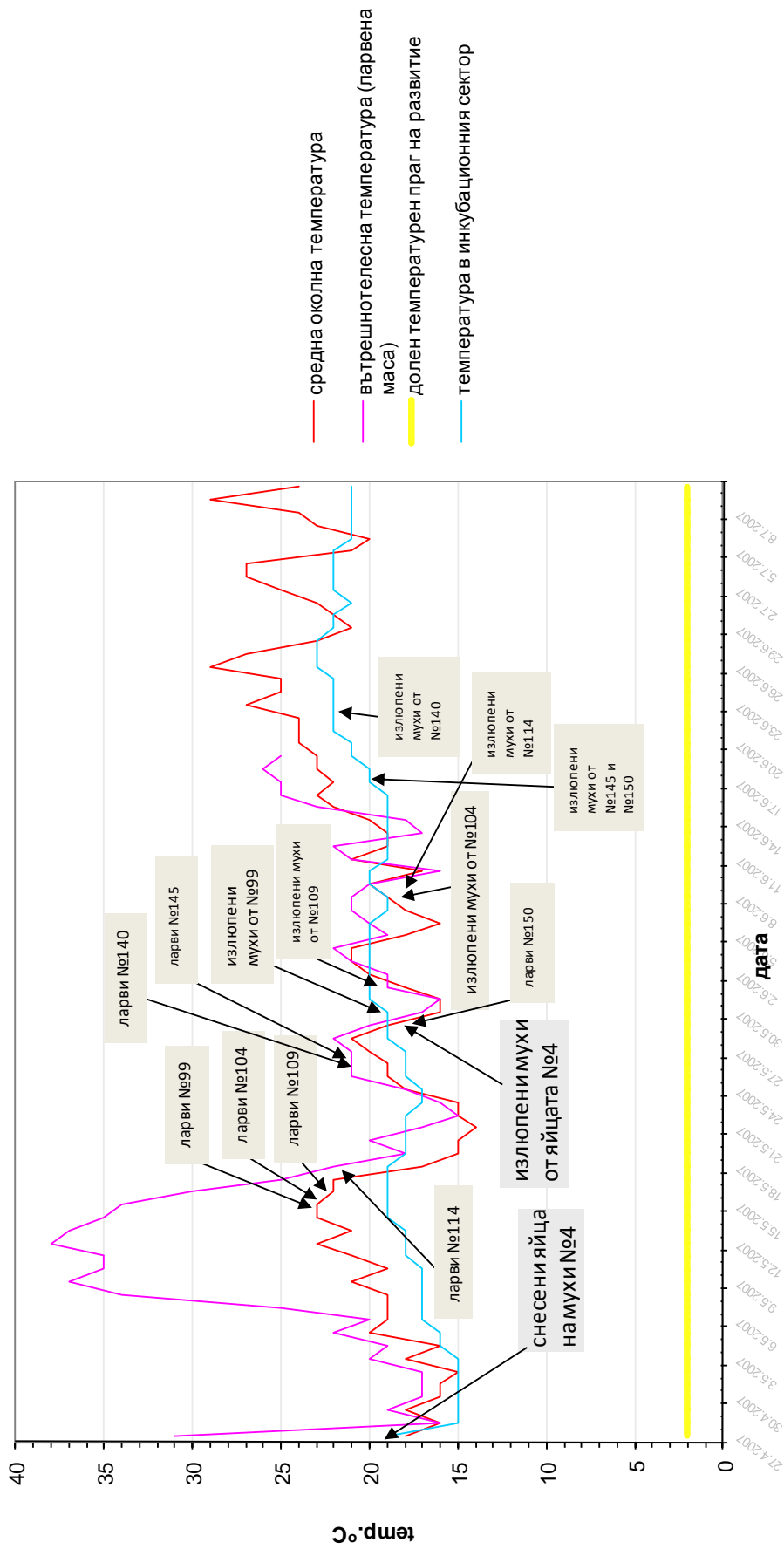
Свинският труп е поставен на мястото в 10,00 часа на 27.04.2007 г. и още 10-15 минути след поставянето му се появяват трупни мухи – предимно от вида *Calliphora vicina* (синя трупна месарка) и единични екземпляри от вида *Calliphora vomitoria*. Времето е тихо, слънчево, на моменти с поява на вятър. Няколко часа след това се наблюдават вече снесени гроздове от яйца на мухи в устната кухина, отдолу на езика. Съгласно методиката се изземват мухи и яйца. Излюпените от тези яйца при лабораторни условия мухи са от вида *Calliphora vicina* (на 31.05.2007 г.). През последващите дни от експеримента ежедневно се извършват наблюдения и се изземват живи образци и такива в етанол.

Не всички иззети живи образци успешно завършват цикъла си на развитие в лабораторни условия, което е обичайно явление, но с усъвършенстване на техниката и оборудването това съотношение може да се понижи в полза на успешната инкубация.

Около 11-17.05.2007 г., се наблюдава дисперсия на ларвите около трупа (след III стадий завършват храненето и се разпръсват за преминаване в стадий на пупарии –

какавиди). През този период трупът е силно спаднал по обем и почти не се наблюдават зрели мухи да летят и кацат наоколо. В края на периода се наблюдават и първите какавиди на мухи в земята наоколо и под трупа.

Температурни параметри (°C) по време на пролетното експериментално изследване, Габрово, 2007



Излюпените мухи от иззетите през периода на експеримента яйца и ларви са преобладаващо от вида *Calliphora vicina* и само няколко екземпляра са от вида *Calliphora vomitoria* (от №104 и №109). И двата вида са характерни за смяна на сезоните и хладно време – предимно през пролетта и есента, издържливи са на пониски температури. Други видове мухи на мястото на експеримента и върху трупа се появяват при топло време, но не го колонизират и не се установяват техни ларви.

Показаната графика с температурни данни (по повечето параметри идентични), се отнася за *Calliphora vicina* с долен праг на развитие (LDT) $+2^{\circ}\text{C}$; за *Calliphora vomitoria* долен температурен праг на развитие е $+3^{\circ}\text{C}$. Това се има предвид при изчисляване параметрите на развитие за всеки вид.

Дефиниции:

Топлинна константа на вида – това е сума от ефективните температури (предизвикващи постъпателно развитие на вида – разлика между външната температура и LDT) - ADD, необходими за преминаване на пълен цикъл на развитие за всеки вид. Видово-специфичен показател. По него се определя продължителността на развитие при конкретни условия на външната среда и ареал на разпространението.

Индекс на развитието – това е част от развитието, която се извършва от вида за единица време (час или денонощие) при дадена температура. При това продължителността на цялото развитие от яйце до имаго (зряло насекомо) се приема условно за единица. Индексът на развитие при конкретна температура се определя чрез разделяне на единицата върху продължителността на развитието при дадена температура, ако тя се запазва непроменена по време на целия цикъл на развитие.

При изчисляване на данните за развитието на мухите се взема предвид периодът от време, през който цикълът на развитие е бил на мястото на експеримента, и периодът в лабораторни условия при инкубацията до зряло насекомо, със съответните температури.

За да се пресметнат акумулираните градус-дни, се събират температурите от всички дни на определения цикъл на развитие на мухите от яйце до зряло насекомо, като се изваждат базовите температури (долен праг на развитие - LDT) от средната дневна температура. В случая се получава цифрата **574 ADD** - топлинна константа за *Calliphora vicina* в нашия експериментален модел. Литературните данни (Марченко, 1991, 2001) дава цифрата 388 ADD, която е различна от намерената. Съгласно същия автор, при средна температура $+18^{\circ}\text{C}$ почасовият индекс на развитие за вида е $17,182 \times 10^{-4}$. Ако изчислим с този индекс развитието на мухите от експеримента, се получава сбор за 35-те дни от 1,443288 което е над 1,0 – толкова трябва да е крайният сбор от почасовите индекси. Ако на база на нашите данни изчислим почасов индекс на развитие, то се получава **$11,90476 \times 10^{-4}$** . Това е цифрата, отговаряща на средната температура в конкретния случай $+18,4^{\circ}\text{C}$, при нашите географски условия.

Резултати от инкубирани ларви, иззети в по-късни периоди: №99 от 15.05.2007 г., излюпени на 30-31.05.2007 г.; №104 от 16.05.2007 г., излюпени на 09.06.2007 г., включително и *Calliphora vomitoria*; №109 от 17.05.2007 г., излюпени на 04.06.2007 г. – включително и *Calliphora vomitoria*; №114 от 18.05.2007 г., излюпени на 09.06.2007 г.; №140 от 26.05.2007 г., излюпени около 24.06.2007 г.; №145 от 27.05.2007 г., излюпени на 15-20.06.2007 г.; №150 от 29.05.2007 г., излюпени на 14-20.06.2007 г.

Ако се проведат изчисления за образците от ларви, иззети по-късно по време на експеримента, то се получава:

- за №99 – 567 ADD, при средна температура +18,7°C за 34 дни;
- за №104 – 748 ADD за *Calliphora vicina* и 704 ADD за *Calliphora vomitoria* (472 по литературни данни), при средна температура +19°C за 44 дни;
- за №109 - 663 ADD за *Calliphora vicina* и 624 ADD за *Calliphora vomitoria*, при средна температура +19°C за 39 дни;
- за №114 – 749 ADD, при средна температура +19°C за 44 дни;
- за №140 – 923 ADD, при средна температура +17,6°C за 59 дни;
- за №145 – 842 ADD, при средна температура +18,8°C за 50 дни;
- за №150 – 825 ADD, при средна температура +18,5°C за 50 дни;

Тук средните температури (средно аритметично от сбора на температурите от мястото и от лабораторията след изземването) се различават от първия резултат, който е изцяло при лабораторни условия.

Тези данни също се разминават в абсолютни стойности, което можем да обясним с неопитността на изследвателя при този първи по рода си експеримент и вероятността да са събирани от трупа ларви в III стадий, но на различна възраст, съответно завършването на жизнения им цикъл също е различно. Вероятно трябва да се вземат предвид и валежите през периода, които водят до отмиване на най-горните и възрастни ларви, които са и най-силни и използват най-отгоре, а по трупа остават по-младите и слабите.

В литературата от различни региони също се наблюдават големи вариации, което показва значимостта от местни изследвания, при това повече на брой и при различни условия.

II. Втори експеримент: лятно експериментално изследване (2007 год.)

Лятното експериментално изследване започна на 27.07.2007 г. и завърши на 17.10.2007 г. (дата на прекратяване на наблюдението и записи на състоянието). Общо наблюденията продължават осемдесет и три (83) дни. Събрани са сто петдесет и осем (158) контейнера с насекоми за целия период, съдържащи няколко хиляди зрели

индивида и ларви на мухи (разред *Diptera*) и други видове членестоноги (разред *Coleoptera*, *Hymenoptera* и др.).

Трупът на прасето, с маса 22 кг, се разлага при тези атмосферни условия от прясно до скелетирано състояние (суха кожа и отделни кости) за период от около 40 дни. На 2-рия ден започна видимо разложение с подуване и лек гнилостен мирис. Разложението бързо се развива още от 3-тия ден с гнилостна подкожна венозна мрежа и е силно изразено към 4-ти – 5-ми ден, с промени в цвета към потъмняване, сукървица, значителен гнилостен мирис. Към 7-ми ден спада обемът на меките тъкани на цялото тяло, кожата е с мехури на много места, в които има и ларви. Към 11-тия ден обемът е спаднал силно - над $\frac{1}{2}$. Постепенно се променят и мастните тъкани. Поради дъждовете и влажното време, изсъхването се наблюдава след 20-тия ден. Към 23-ти – 24-ти ден вече почти не са останали меки тъкани. Към 28-ми – 29-ти ден от трупа са останали почти кожа и кости. На 40-тия ден трупът е на нивото на земята.

На 20-тия ден от началото на експеримента се наблюдават излюпващи се млади мухи с неразгънати криле от какавидите под и около трупа – от вида *Chrysomia albiceps*. От иззетите по време на експеримента ларви от трупа се излюпват при лабораторни условия мухи от същия вид - *Chrysomia albiceps*, както и от вида *Lucilia sericata*, и една група от вида *Lucilia ampullacea* (от №29). Видовете са характерни за топлия сезон – предимно през лятото. Ларвите на *Chrysomia albiceps* освен с трупни тъкани, по време на II и III стадий се хранят и със себеподобни от други видове (вид канибализъм) и по този начин успешно се конкурират и изместват от хранителния ресурс ларвите на останалите видове мухи.

Резултати от инкубацията:

Lucilia sericata - №4 от 27.07.2007 г., излюпени на 23.08.2007 г.; №8 от 28.07.2007 г., излюпени на 12-13.08.2007 г.; №34 от 03.08.2007 г., излюпени на 13.08.2007 г.; №44 от 05.08.2007 г., излюпени на 13-14.08.2007 г.; №51 от 07.08.2007 г., излюпени на 13-14.08.2007 г.;

Chrysomia albiceps - №35 от 03.08.2007 г., излюпени на 12-13.08.2007 г.; №40 от 04.08.2007 г., излюпени на 14-15.08.2007 г.; №43 от 05.08.2007 г., излюпени на 16.08.2007 г.; №50 от 07.08.2007 г., излюпени на 17.08.2007 г.;

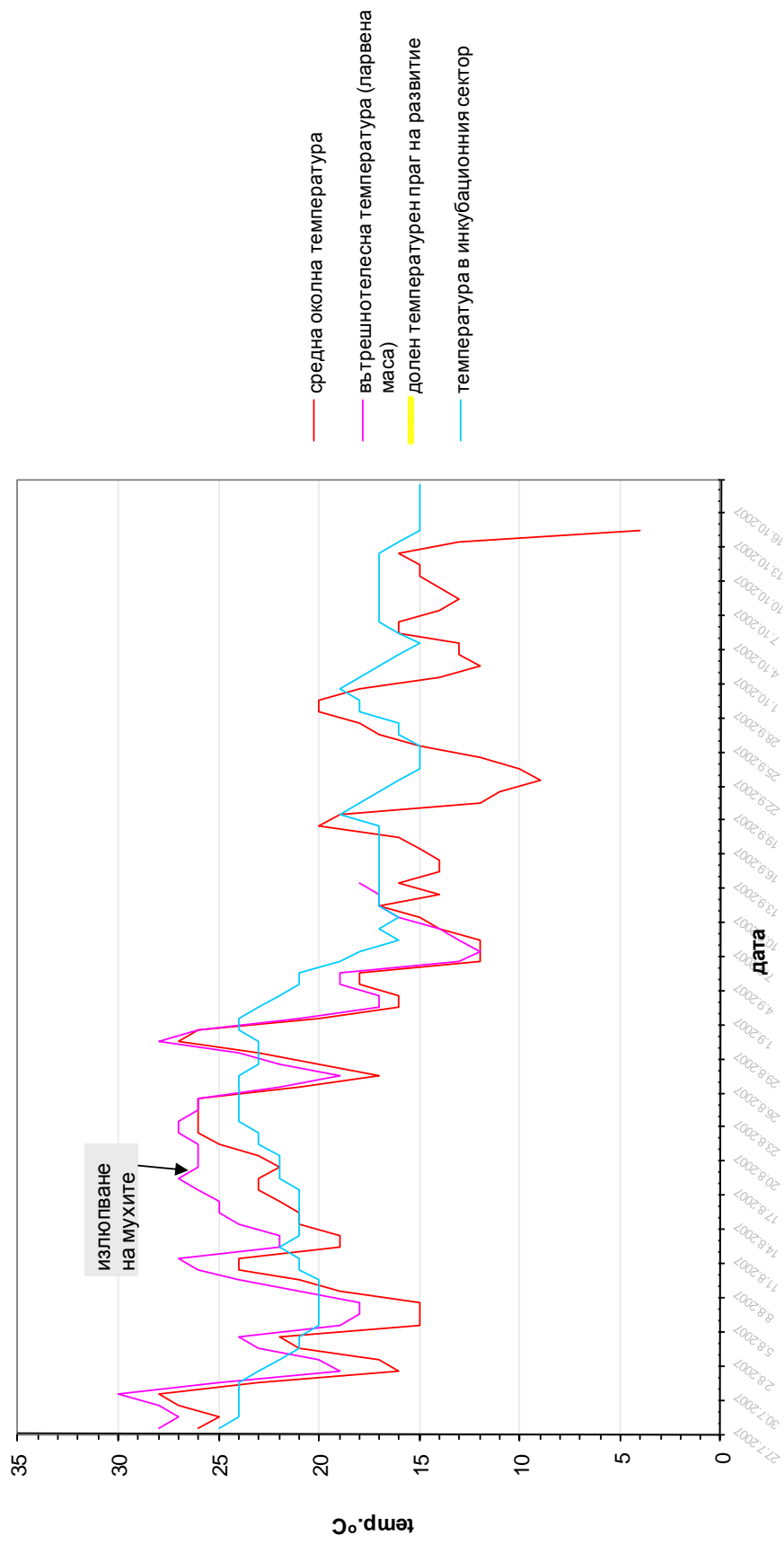
Lucilia ampullacea - №29 от 02.08.2007 г., излюпени на 12-13.08.2007 г.;

Когато проведем изчисления за времето и температурните данни за развитието на мухите, които са се излюпили върху трупа на мястото на експеримента, на 15.08.2007 г., се получават следните резултати: - топлинна (температурна) константа на вида **214** ADD (акумулирани градус-дни); долният праг на развитие (LDT) за *Chrysomia albiceps* е $+10,2^{\circ}\text{C}$ (по Марченко и Кононенко, 1991), а по същия автор температурната константа на вида е 186 ADD – близка до данните за нашата популация на вида цифра. Средната денонощна температура на мястото за периода е $+20,9^{\circ}\text{C}$, при която ($+20^{\circ}\text{C}$) по литературни данни почасовият индекс на развитие е $24,258 \cdot 10^{-4}$, а при ($+19^{\circ}\text{C}$) е

$22,012 \cdot 10^{-4}$. По наши данни при тази температура почасовият индекс на развитие на *Chrysomia albiceps* е **$20,833 \cdot 10^{-4}$** . Тук може да се има предвид като страничен повлияващ фактор типичната за региона силна амплитуда между дневните и нощните температури и забавяне на развитието през нощта. Спецификата в колебанията на температурите оказва влияние върху скоростта на развитие (в нашия случай – леко намалена).

Долен праг на развитие (LDT) не е посочен, поради няколко вида изолирани мухи с пълен цикъл на развитие в случая.

Температурни параметри (°C) по време на лятното експериментално изследване, Габрово, 2007



По данните от инкубираните ларви при лабораторни условия получаваме следните резултати:

При *Chrysomia albiceps*:

- за №35 от 03.08.2007 г., излюпени на 12-13.08.2007 г. – топлинна константа 184,4 ADD, при средна температура +21,7°C за 17 дни;
- за №40 от 04.08.2007 г., излюпени на 14-15.08.2007 г. – 217,2 ADD, при средна температура +21,8°C за 19 дни;
- за №43 от 05.08.2007 г., излюпени на 16.08.2007 г. – 233,8 ADD, при средна температура +21,3°C за 21 дни;
- за №50 от 07.08.2007 г., излюпени на 17.08.2007 г. – 234,6 ADD, при средна температура +20,9°C за 22 дни; средно 217,5 ADD.

При *Lucilia sericata* (долен праг на развитие LDT +9,0°C)

- за №4 от 27.07.2007 г.(яйца), излюпени на 23.08.2007 г. – топлинна константа 361 ADD, при средна температура +21,9°C за 28 дни;
- за №8 от 28.07.2007 г., излюпени на 12-13.08.2007 г. – 219 ADD, при средна температура +21,9°C за 17 дни;
- за №34 от 03.08.2007 г., излюпени на 13.08.2007 г. – 227 ADD, при средна температура +21,6°C за 18 дни;
- за №44 от 05.08.2007 г., излюпени на 13-14.08.2007 г. – 223 ADD, при средна температура +21,4°C за 18 дни;
- за №51 от 07.08.2007 г., излюпени на 13-14.08.2007 г. - 213 ADD, при средна температура +20,8°C за 18 дни; по литературни данни (Марченко и Кононенко, 1991) топлинната константа на вида е 207 ADD.

При *Lucilia ampullacea* (LDT не е определен, вероятно е близък до този на вида *Lucilia sericata* +9°C)

- за №29 от 02.08.2007 г., излюпени на 12-13.08.2007 г. – 215 ADD, при средна температура +21,7°C за 17 дни;

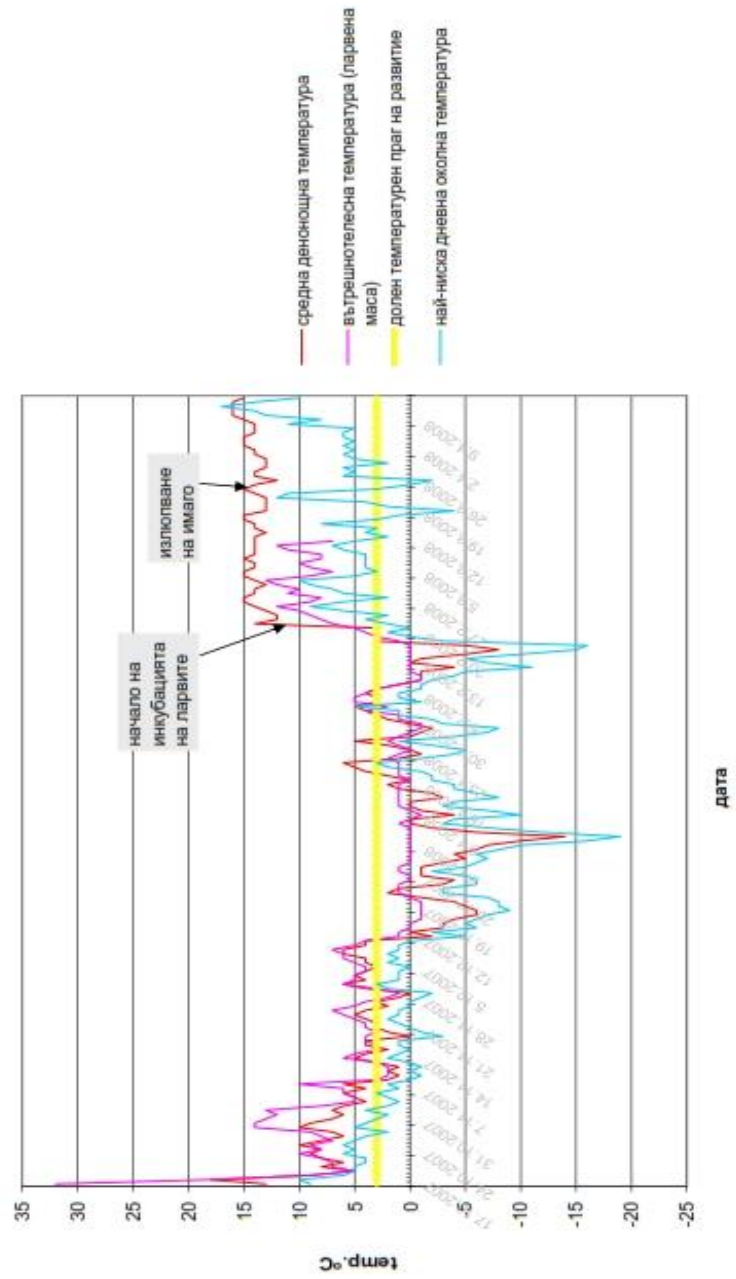
III. Трети експеримент: есенно-зимно експериментално изследване (2007/2008 год.)

Есенно-зимното експериментално изследване започна на 17.10.2007 г. и завърши на 06.05.2008 г. (дата на прекратяване на наблюдението и записи на състоянието). Общо наблюденията продължиха двеста и два (202) дни. Събрани са сто и единадесет (111) контейнера с насекоми за целия период, съдържащи няколко хиляди зрели

индивида и ларви на мухи (разред *Diptera*) и други видове членестоноги (разред *Coleoptera*, *Hymenoptera* и др.).

Температурата на околния въздух на първия ден е около 19,5°C. Вътрешната температура на трупа в началото на записа е 32,0°C. Наблюдава се поява на възрастни мухи от семейство *Calliphoridae*, които снасят яйца по трупа, още в първия час след поставянето на трупа. Първите ларви са излюпени на 3-тия ден. Данните за средноденонощните температури на околния въздух, вътрешнотелесната температура (температура на ларвените маси), температурите в зоната за инкубация и най-ниските денонощни температури на околния въздух от експеримента са отразени на графиката.

Температурни параметри (°C) по време на есенно-зимното експериментално изследване, Габрово, 2007/2008



През топлия есенен период не се наблюдава пълен цикъл на развитие на снесените яйца на мухи (развитието е по-бавно и продължава през зимния период). През зимата има дълги периоди от околни температури под нулата и под нивото на долния температурен праг на развитие ($+3^{\circ}\text{C}$) за наблюдавания вид мухи (вижда се добре на графиката).

Първите мухи се излюпват от какавидите (пупариите) през последните дни на март 2008 г., като поради риска от смесване на поколенията на мястото на експеримента, се инкубират късни ларвени стадии от последните по-студени дни. Зрелите индивиди са идентифицирани като представители на *Calliphora vomitoria* sp. През зимата са наблюдавани постоянно активни ларви на мухи във вътрешността на трупа, при околни температури, достигащи до -19°C . В същото време, температурата на ларвените маси варира приблизително между 0°C до $+2^{\circ}\text{C}$. Съгласно публикуваните данни за *Calliphora vomitoria* – долният температурен праг на развитие (LDT) е $+3^{\circ}\text{C}$. Сумата на ефективните температури на развитие от яйце до какавида (пупариум) е 213,0. Температурната константа на вида е **472,0** ADD (Marchenko, 2001). 0,0169488 е 24-часовият индекс на развитие на *Calliphora vomitoria* при средноденонощна околна температура (най-ниската изучена) $t_{\text{amb}}^{\circ} = +11^{\circ}\text{C}$. (Марченко и Кононенко, 1991).

При нашето изследване се отчитат необходими 160 (сто и шестдесет) дни време за развитие от снасянето на яйцата до излюпване на зрелите мухи. Изчислена е температурна константа на развитие за *Calliphora vomitoria*, излюпили се при нашето изследване = **478,0** ADD (акумулирани градус-дни), което почти съвпада с публикуваните преди данни. Калкулираният от нас 24 – часов индекс на развитие е 0,00625 при средна температура на околния въздух $t_{\text{amb}} = +5,34^{\circ}\text{C}$ за наблюдавания период.

Получените от нас резултати относно важния показател от акумулирани градус-дни ADD почти съвпадат с данните от цитираните изследвания на други автори, което показва ниска популационна вариация на параметрите за вида.

IV. Четвърти експеримент: лятно експериментално изследване (2008 год.)

Второто лятно експериментално изследване започна на 22.07.2008 г. и завърши на 02.09.2008 г. (дата на прекратяване на наблюдението и записите на състоянието). Общо наблюденията продължиха четиридесет и три (43) дни. Събрани са деветдесет (90) контейнера с насекоми за целия период, съдържащи няколко хиляди зрели индивиди и ларви на мухи (разред *Diptera*) и други видове членестоноги (разред *Coleoptera*, *Hymenoptera* и др.).

Трупът на прасето, с маса 22 кг, се разлага бързо при тези атмосферни и биотопни условия от прясно до скелетирано състояние (суха кожа и отделни кости) за период от около 15 дни. Още в ранния следобед на 1-вия ден започва проливен дъжд с гръмотевици. На 2-рия ден започва начално разложение със слабо подуване и лек гнилостен мирис. Разложението бързо се развива още от 3-4-тия ден с постепенно подуване и е силно изразено към 4-ти – 5-ми ден, с промени в цвета към позеленяване,

значителен гнилостен мирис, обилно количество ларви на мухи. На 7-ми ден температурата спада с проливен дъжд през целия ден. На 10-тия ден силно е спаднал обемът на меките тъкани на цялото тяло, кожата е пожълтяла на места, усеща се лек мирис на хлор. Към 11-тия ден обемът е спаднал силно и са останали почти само кожа (проядена и пробита в горната и средна част), кости и сухожилия, виждат се много мигриращи встрани от трупа в почвата ларви. На 15-тия ден трупът е на нивото на земята, с останали малко суха кожа, кости, само по крайниците има още малко меки тъкани – мастна тъкан и сухожилия.

На 19-тия ден от началото на експеримента (09.08.2008 г.) се наблюдават излюпващи се млади синьо-зелени лъскави мухи с по-бледа оцветка, мехурче отпред на главата и неразгънати криле, върху и около трупа – определят се от вида *Chrysomia albiceps*. От иззетите по време на експеримента ларви от трупа се излюпват при лабораторни условия мухи от същия вид - *Chrysomia albiceps*, както и от вида *Lucilia caesar*, и по-малки количества от видовете *Musca domestica*, *Muscina stabulans*, *Sarcophaga Liopygia* (снасяща ларви муха-месарка), *Calliphora vicina*, *Eudasyphora sp.* Видовете са разнообразни, някои от тях характерни за летния сезон, други и за по-хладно време, за човешки местообитания (*Musca domestica* – домашна муха), а някои са сравнително рядко срещани – като *Muscina stabulans*, *Eudasyphora sp.* Ларвите на *Chrysomia albiceps* (изглеждат покрити с шиповидни израстъци – „бодливи” ларви) освен с трупни тъкани, по време на II и III стадий се хранят и със себеподобни от други видове (вид канибализъм) и по този начин успешно се конкурират и изместват от хранителния ресурс ларвите на останалите видове мухи, което им дава възможност да се развиват дори и при малко яйцеснасяне.

Резултати от инкубацията:

Musca domestica и *Muscina stabulans* - №11 от 25.07.2008 г., излюпени на 21-22.08.2008 г.;

Sarcophaga (Liopygia) - №27 от 30.07.2008 г., излюпени на 02.09.2008 г.;

Calliphora vicina - №38 от 01.08.2008 г., излюпени на 9-11.08.2008 г.;

Calliphora vomitoria - №41 от 02.08.2008 г., излюпени на 17.08.2008 г.;

Lucilia caesar - №32 от 31.07.2008 г., излюпени на 21.08.2008 г.; №37 от 01.08.2008 г., излюпени на 21.08.2008 г.; №41 от 02.08.2008 г., излюпени на 17.08.2008 г.; №61 от 06.08.2008 г., излюпени в дните преди 23.08.2008 г.;

Chrysomia albiceps - №38 от 01.08.2008 г., излюпени на 9-11.08.2008 г.; №43 от 02.08.2008 г., излюпени на 10-11.08.2008 г.; №49 от 03.08.2008 г., излюпени на 10-11.08.2008 г.; №57 от 05.08.2008 г., излюпени на 10-11.08.2008 г.;

Eudasyphora sp. - №53 от 04.08.2008 г., излюпени на 22.08.2008 г.;

При четвъртия експеримент са събрани и идентифицирани повече различни видове мухи, извършили пълен цикъл на развитие, по две причини – специфика на климатичните условия за периода и значително повишен практически опит при изследването и идентификацията.

Когато проведем изчисления за времето и температурните данни на развитие на мухите от вида *Chrysomia albiceps*, които са се излюпили върху трупа на мястото на експеримента, на 09.08.2008 г., се получават следните резултати: - топлинна (температурна) константа на вида **189,2** ADD (акумулирани градус-дни); при долен праг на развитие (LDT) за *Chrysomia albiceps* +10,2°C (по Марченко и Кононенко, 1991), а по същия автор температурната константа на вида е 186 ADD – много близка до данните за нашата популация на вида цифра. Средната денонощна температура на мястото за периода е +20,2°C, при която (+20°C) по литературни данни почасовият индекс на развитие е $24,258 \cdot 10^{-4}$. По наши данни при тази температура почасовият индекс на развитие на *Chrysomia albiceps* е **21,93**·10⁻⁴. Тук също може да се има предвид като страничен повлияващ фактор типичната за региона силна амплитуда между дневните и нощните температури и забавяне на развитието през нощта. Спецификата в колебанията на температурите оказва влияние върху скоростта на развитие (в нашия случай – леко намалена).

По данните от инкубираните ларви при лабораторни условия получаваме следните резултати:

При *Chrysomia albiceps*

- за №38 от 01.08.2008 г., излюпени на 9-11.08.2008 г. – на 09.08. – 175 ADD, на 10.08. – **183** ADD, на 11.08. – 192,8 ADD, при средна температура +19,4°C за 19-21 дни;
- за №43 от 02.08.2008 г., излюпени на 10-11.08.2008 г. – на 10.08. – **185** ADD, на 11.08. – 194,8 ADD, при средна температура +19,5°C за 20-21 дни;
- за №49 от 03.08.2008 г., излюпени на 10-11.08.2008 г. – на 10.08. – **186** ADD, на 11.08. – 195,8 ADD, при средна температура +19,5°C за 20-21 дни;
- за №57 от 05.08.2008 г., излюпени на 10-11.08.2008 г. – на 10.08. – **191** ADD, на 11.08. – 200,8 ADD, при средна температура +19,8°C за 20-21 дни;

При *Musca domestica*

- за №11 от 25.07.2008 г., излюпени на 21-22.08.2008 г. – (при долен праг на развитие LDT +12,7°C) – 225,3 ADD, при средна температура +20°C за 31 дни; тук резултатът по-скоро посочва, че домашната муха е снесла яйца върху контейнера с пробата и се е развила вторично. Нормално при тази температура видът се развива за 19 дни.

При *Muscina stabulans*

– за №11 от 25.07.2008 г., излюпени на 21-22.08.2008 г. – (при долен праг на развитие LDT +7,2) – 395,8 ADD, при средна температура +20°C за 31 дни; по литературни данни тази цифра би следвало да е около 269 ADD – имаме по-голямо разминаване в цифрите, за което трябва да се търси обяснение, може би като по-горното;

При *Sarcophaga (Liopygia)*

– за №27 от 30.07.2008 г., излюпени на 02.09.2008 г. – развитието е протекло за 43 дни при средна температура около +20,5°C; нямаме температурни данни за вида;

При *Calliphora vicina*

– за №38 от 01.08.2008 г., излюпени на 9-11.08.2008 г. – (долен температурен праг на развитие LDT +2°C) – на 09.08. – 330 ADD, на 10.08. – 348 ADD, на 11.08. – **366** ADD, при средна температура +19,4°C за 19-21 дни; по литературни данни – 388 ADD;

При *Calliphora vomitoria*

– за №41 от 02.08.2008 г., излюпени на 17.08.2008 г. – (долен температурен праг на развитие LDT +3°C) – **459** ADD, при средна температура +20°C за 27 дни; по литературни данни – 472 ADD;

При *Lucilia caesar*

– за №32 от 31.07.2008 г., излюпени на 21.08.2008 г. – за 31 дни при средна температура +20,1°C;

- за №37 от 01.08.2008 г., излюпени на 21.08.2008 г. – за 31 дни при средна температура +20°C;

- за №41 от 02.08.2008 г., излюпени на 17.08.2008 г. – за 27 дни при средна температура +20°C;

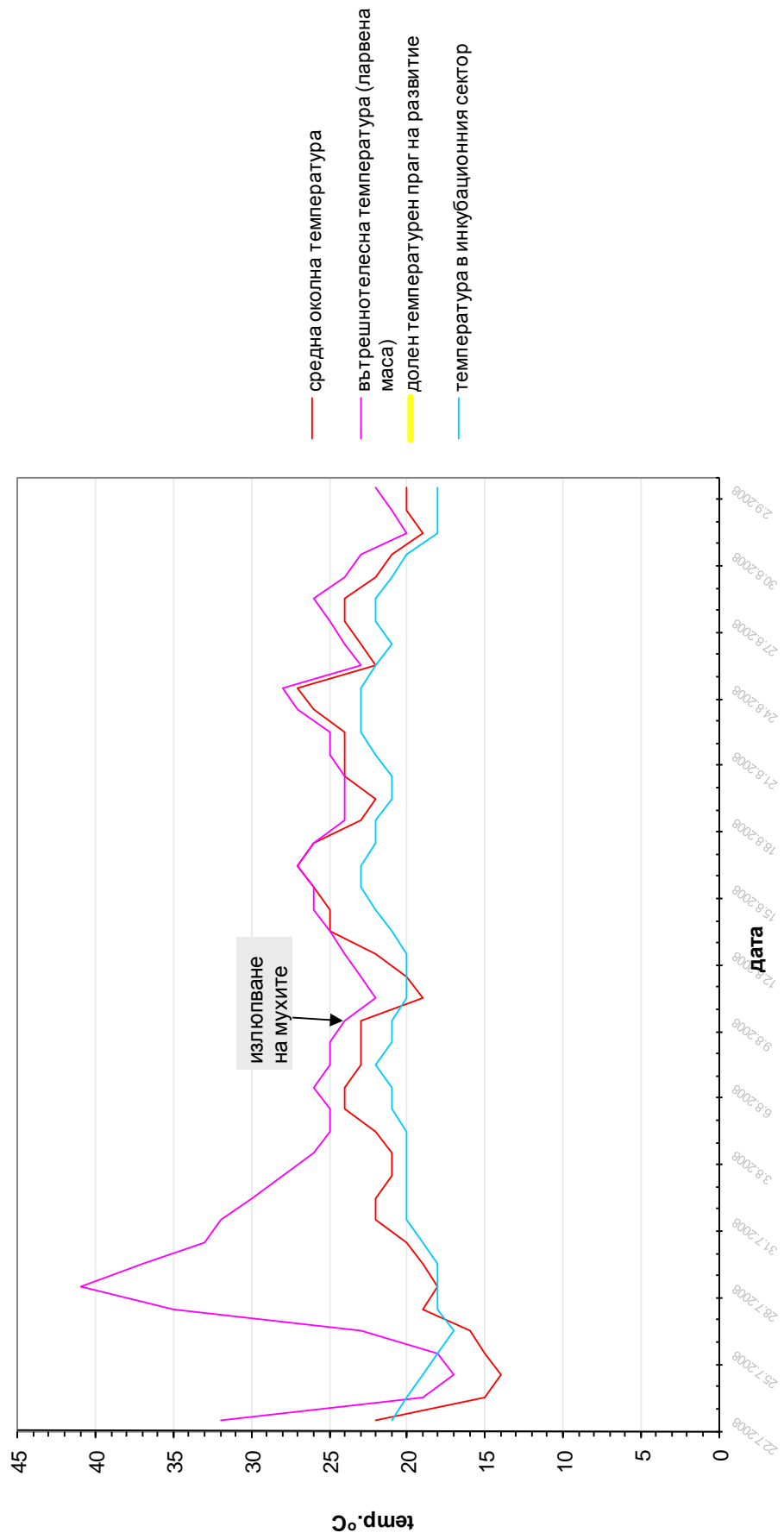
- за №61 от 06.08.2008 г., излюпени в дните преди 23.08.2008 г. – за около 28-31 дни при средна температура около +20°C;

При *Eudasyphora sp.*

– за №53 от 04.08.2008 г., излюпени на 22.08.2008 г. – за 32 дни при средна температура +19°C; - рядък вид по трупни останки, няма данни за температурите на развитие.

При четвъртия експеримент се установяват повече видове мухи, развиващи се върху трупа. По-големият опит при изземването и инкубирането се отразява и върху по-точните крайни резултати – температурните показатели (описани по-горе) най-точно съответстват на литературните, въпреки че има допустими популационни особености, които именно са предмет и на нашето изследване.

Температурни параметри (°C) по време на лятното експериментално изследване, Габрово, 2008



Данни от действителни случаи в практиката

Първите случаи (7 от тях са представени по-долу), които са решени с използването на ентомологични данни, със своите резултати дават надежда за бъдещето на дисциплината в България и за утвърждаването на статута ѝ на национално равнище.

I. Първият случай засяга две жени – 83-годишна майка и 57-годишната ѝ дъщеря, чиито вече разложени трупове са открити в апартамента им. Какавиди на мухи са намерени в гънките на дрехите им и около телата. Като се съди по времето на излюпване на зрели мухи (от вида *Calliphora vicina*) от тях след инкубация, става ясно, че майката е починала 3 дни преди дъщерята, а давността на смъртта им е приблизително 19-21 дни преди откриването на телата.

II. Вторият случай е също за два трупа, намерени в градска къща – на майка и сина ѝ (съответно на 61 и 36 години), като има информация, че и двамата са страдали от психични заболявания. Съдебномедицинската експертиза разкрива факта, че майката е починала от интоксикация с таблетки Levomepromazin, а синът е погълнал натриева основа. Намерени са яйца на мухи в телесните отвори и по кожата на жената, а не са открити по сина ѝ; също така са уловени летящи наоколо възрастни мухи *Lucillia sericata*. Въз основа на данните от аутопсията и от ентомологичните доказателства, експертизата стига до заключението, че майката е починала 1-2 дни преди огледа, а синът е починал рано сутринта в деня на намирането и огледа на местопроизшествието (в късния следобед).

III. В третия случай 85-годишен старец е намерен починал в дома си на село, като тялото му е в стадий на напреднало трупно разложение. Къщата е намерена с откритата врата и изкъртена ключалка, и във вътрешността на къщата царят безпорядък. Нараства подозрението, че е възможен грабеж и може би се касае за убийство. По време на аутопсията в същия ден са установени множество какавиди по тялото и дрехите, а също така множество яйца на мухи и няколко живи екземпляра на мухи от вида *Lucillia serricata* sp., както и няколко бръмбара от рода *Staphylinidae*. След инкубация и отглеждане на какавидите, от тях се излюпват *Musca domestica* – домашна муха и се изчислява постморталния интервал – най-малко 6 дни, съгласно наличните температурни данни. При аутопсията няма признаци за насилствена смърт, явно това е случай на скоропостижна смърт. Обобщавайки данните, особено ентомологичните доказателства, съдебномедицинската експертиза стига до заключението, че мъжът е починал преди около седмица в затворената къща (намерени са типичните за битови условия в закрити помещения *Musca domestica* – домашни мухи, които колонизират трупове в отсъствието на други, типични трупни видове) и един ден преди откриването и огледа някой е взломил вратата и претърсил къщата (вероятно с цел кражба), но виждайки трупа е избягал. В в този момент мухи от вида *Lucillia sericata* и други насекоми са навлезли в къщата през откритата врата.

IV. Четвъртият случай е за 41-годишен мъж, който е изчезнал през есента и неговите скелетни останки са намерени през пролетта на следващата година, 6 месеца по-късно, разхвърляни наоколо в рядка иглолистна гора. Под единично широколистно дърво наблизко в гората, близо до няколко скелетни части, се установява влажна прогизнала зона от почвата с размери около 50x35cm. В тази зона се виждат множество „скачащи” живи ларви на мушицата *Piophilha casei* (типични за напреднало трупно разложение) в почвата под шумата, а също така има слаб гнилостен мирис на мястото. Този факт и намереният на същото място пръстен водят до заключението, че това е мястото, където тялото на починалия е лежало по-продължително време след смъртта, преди едри хищници да са разнесли останките му наоколо.

V. Петият случай се отнася за обявен за издирване изчезнал 69-годишен мъж, който се изгубил по време на разходка за гъби в планински регион през октомври 2009 година. Тялото му е открито след дълго търсене, на 16-ти януари 2010 година, лежашо под тънък пласт сняг, частично в плитката 3-4 см вода на малко планинско ручейче. Тялото е без признаци за травми, и като причина за смъртта се установява внезапна сърдечна смърт (на фона на исхемична болест на сърцето). По тялото под дрехите в областта на гръдния кош и шията се откриват още на местопроизшествието множество живи ларви (плътна маса), както и какавиди на мухи от вида *Calliphora vicina*. Намерени са и малко живи ларви на мухи от вида *Piophilha casei* и няколко малки бръмбара от рода *Staphylinidae* в дрехите. Меките тъкани на лицето и шията и част от кожата отпред на гръдния кош липсват и по краищата са пенетрирани от ларвите. Околните температури през периода на откриването са около и под нулата (за повече от месец през късния декември и през януари). Интересен факт (подобен на третият, есенно-зимен експеримент с прасе) е оцеляването на ларвите и активността им при минусови температури, най-вероятно поради късната есенна колонизация на трупа и поради формирането на продуциращи топлина ларвени маси.

VI. Шестият случай разкрива убийство. На 12-ти март 2010 година, син убива баща си с два удара с дървена бухалка по главата. След смъртта тялото веднага е увито в одеяло и пакетирано в найлон и преместено в мазето, където е зазидано в дебел слой бетон (като саркофаг). След като обявил баща си за изчезнал през март, на 20-ти юли след издирвателни действия синът признава за убийството и тялото е открито след разкъртването на бетона. Преди премахването на бетона, до него в оскъдно количество на пода е намерена малка полуизсъхнала локвица от кафеникаво-червеникава течност (по-късно определена като сукървица), явно процеждаща се през бетона с тялото. На същото място се откриват и изземват няколко живи ларви и какавиди от домашната муха *Musca domestica* – скоро след това се излюпват зрели мухи от какавидите. Не може да се установи, кога сукървицата от разлагачия се труп се е процедила през бетона, но присъствието на насекомите сочи мястото на трупа.

VII. Седмият случай е за 80-годишен мъж, намерен мъртъв в къщата си в планинско село, в стадий на трупно разложение. Тялото е открито на 19-ти май 2010 година и по време на аутопсията (установява се естествена смърт) се намира голямо количество ларви и какавиди на мухи по тялото и в гънките на дрехите по него. Още по

време на аутопсията се наблюдава масово излюпване на млади мухи от част от какавидите (пупариите) – същите се идентифицират като *Protophormia terraenovae*. Другите видове (излюпили се в последващите дни след инкубация) са от видовете *Calliphora vicina* и *Chrysomia albiceps*. По тялото са намерени също и единични образци от бръмбари – *Dermestes* и *Necrophorus*. Съгласно температурните данни от локалната метеорологична станция (средна околна температура +14°C) и времето на излюпване на зрелите мухи, се калкулира времето от настъпване на смъртта да е най-малко 48-50 дни. Типична екологична особеност на вида *Protophormia terraenovae* е появата ѝ в закрити помещения през студените дни на пролетта.

Освен гореописаните, от повечето ни случаи в съдебномедицинската практика, при които върху трупове се откриват колонизиращи ги насекоми, те се изземват като образци и се изследват, дори това да не е от значение за конкретните казуси (в смисъл, че давността на смъртта е определена чрез свидетелски показания или случаите са маловажни за разследването и не се събират метеорологични данни). За нас обаче тези случаи са важни, от гледна точка на събирането на факти за характерните за географския регион мухи, които при жизнения си цикъл използват човешки трулове. Това дава възможност да се сумират по-голям обем данни за анализ, да се потвърдят експерименталните данни и да се определят видовете с потенциално важно съдебномедицинско значение.

№ на случая	месец и година	Видове идентифицирани върху трупа мухи (или ларви)	регион
СМ-21	03.2007	<i>Calliphora vicina</i> <i>Calliphora vomitoria</i>	с. Старилковци, общ. Габрово, в гора до р. Янтра
СМ-18	03.2007	<i>Calliphora vicina</i>	гр. Габрово, в къща
СМ-22	05.2008	<i>Calliphora vicina</i>	гр. Габрово
СМ-28	05-06.2008	<i>Calliphora vicina</i> <i>Sarcophaga Lyopigia</i>	гр. Дряново, в къща
СМ-29	06.2008	<i>Lucilia sericata</i>	гр. Севлиево, в къща
СМ-38	06.2008	<i>Chrysomia albiceps</i> <i>Chrysomia megacephala</i>	гр. Габрово, в къща
СМ-46	07.2008	<i>Musca domestica</i> <i>Lucilia sericata</i>	с. Добромирка, общ. Севлиево, в къща
СМ-67	07.2009	<i>Chrysomia albiceps</i> <i>Lucilia sericata</i>	гр. Габрово, кв. Бакойци, на поляна
СМ-71	08.2009	<i>Chrysomia albiceps</i>	гр. Габрово, отворена стая
СМ-102	11.2009	<i>Piophilha casei</i> <i>Fannia scalaris</i>	гр. Габрово, покрайнини, поляна, скелетни

			останки
CM-4	10.2009-01.2010	<i>Calliphora vicina</i> <i>Piophilidae casei</i>	В гората далеч от с. Стомонечи, общ. Габрово, планина
CM-33	04.2010	<i>Calliphora vicina</i>	гр. Габрово
CM-44	04-05.2010	<i>Calliphora vicina</i> <i>Protophormia terraenovae</i> <i>Chrysomia albiceps</i>	с. Стоките, общ. Севлиево, в къща
CM-71	07.2010	<i>Musca domestica</i>	гр. Габрово, в мазе
CM-89	09.2010	<i>Chrysomia albiceps</i> <i>Lucilia caesar</i>	гр. Габрово, в усойно място
CM-92	10.2010	<i>Lucilia caesar</i>	с. Добромирка, общ. Севлиево
CM-15	03.2011	<i>Calliphora vicina</i>	гр. Габрово
CM-29	05.2011	<i>Calliphora vicina</i>	гр. Плачковци, общ. Трявна
CM-87	10.2011	<i>Chrysomia albiceps</i>	с. Боаза, общ. Севлиево в рядка гора
CM-47	05.2012	<i>Protophormia terraenovae</i> <i>Lucilia sericata</i> <i>Lucilia silvarum</i> <i>Calliphora vicina</i> <i>Calliphora vomitoria</i>	с. Сенник, общ. Севлиево, в двора на къща
CM-72	08.2012	<i>Lucilia sericata</i> <i>Chrysomia albiceps</i>	с. Енчовци, общ. Трявна, на веранда

Установява се положителна корелация между видовете мухи, идентифицирани при експериментите и видовете, определени от действителни случаи в практиката. Тези видове, които най-често се срещат върху трупове, са идентични.

5. Обсъждане:

При всичките четири експеримента се наблюдава поява на трупни мухи още в първите минути след поставяне на тялото на открито; Оvipозицията се наблюдава в първите часове на първия ден, като е по-обилна към втория ден. Установява се едно поколение мухи на труповете – след първия цикъл няма повторна колонизация на вече разложения труп – от екологична гледна точка той вече не е атрактант за типичните трупни мухи, а за други видове насекоми. Освен това хранителният субстрат бързо намалява от въздействието на колонизиращите ларви на мухи и други некрофаги.

С нарастване на опита на експериментатора се повишава и качеството на иззетите образци и се подобряват резултатите от инкубацията (повече оживяли ларви). Част от иззетите образци на живи ларви умират по време на инкубацията и това е факт, регистриран и от други изследователи (от лични разговори със съдебни ентомолози - Jens Amendt, Krzysztof Szpila, Dorothy Gennard и др.). Установените топлинни константи на видовете при есенно-зимния и при втория летен експеримент съответстват на данните от референтната литература (Marchenko, 2001), което се обяснява с набрания значителен опит от предходните експерименти.

Съгласно Arnaldos (Arnaldos et al., 2005), нашите резултати посочват Calliphoridae и Muscidae като най-представени семейства мухи (Diptera). Нашите изследвания са подобни на Centeno (Centeno et al., 2002), тъй като те разкриват Calliphoridae, които се появяват още на първия ден на експериментите.

Наблюдава се сезонност на видовете мухи според нивото на температурата на околната среда – през студените периоди на пролетта и есента колонизацията е предимно от *Calliphora vomitoria* и *Calliphora vicina*, отчасти от *Protophormia terraenovae*, а през топлите месеци на лятото, късна пролет и ранна есен - *Lucilia sericata*, *Lucilia caesar*, *Chrysomia albiceps* и рядко някои други видове. Отделно характерна особеност например за *Lucilia caesar* е фактът, че този вид предпочита сенчести места, покрити с редки дървета и храсти (Erzinclioglu, 1996), а за *Protophormia terraenovae* – сенчести и закрити места. Установените данни за сезонността и локализацията на колонизиращите видове мухи отговаря на екологичните им особености (Gennard, 2007).

По-дългите регистрирани периоди на развитие на някои мухи може да се дължат на природните условия (дъждовете, отмиващи най-едриите и възрастни ларви и забавящи колонизацията) и на недостатъчния опит на експериментатора – особено в първите случаи – да се събират най-зрелите ларви от първата овипозиция.

Има определено сходство във видовия профил на мухите от експериментите с труповете на прасета и от реалните случаи с човешки труповете; моделът свински труп се потвърждава като подходящ за подобен експеримент.

Необходимо е да се повишава опитът на ентомолога по отношение идентификацията на ларвите на мухи с цел използване на методиката за определяне на възрастта им по дължината, теглото и вида им.

Изготви се таблица с месеците от годината и съответните характерни за периода видове колонизиращи мухи в региона (с **удебелен шрифт** са посочени преобладаващите видове, които са по-важни от съдебномедицинска гледна точка):

Месеци на годината	Видове мухи, колонизиращи трупа
януари (само в серия топли дни)	<i>Calliphora vicina</i> <i>Calliphora vomitoria</i>
февруари (само в серия топли дни)	<i>Calliphora vicina</i> <i>Calliphora vomitoria</i>
март	<i>Calliphora vicina</i> <i>Calliphora vomitoria</i>
април	<i>Calliphora vicina</i> <i>Calliphora vomitoria</i> <i>Protophormia terraenovae</i> (на закрито)
май	<i>Protophormia terraenovae</i> (на закрито) <i>Lucilia sericata</i> <i>Lucilia silvarum</i> <i>Calliphora vicina</i> <i>Calliphora vomitoria</i> <i>Sarcophaga Lyopigia</i>
юни	<i>Lucilia sericata</i> <i>Chrysomia albiceps</i> <i>Chrysomia megacephala</i> <i>Sarcophaga Lyopigia</i>
юли	<i>Chrysomia albiceps</i> <i>Lucilia sericata</i> <i>Lucilia Caesar</i> <i>Lucilia ampullacea</i> <i>Calliphora vicina</i> <i>Calliphora vomitoria</i> <i>Muscina stabulans</i> <i>Eudasyphora sp.</i> <i>Sarcophaga Lyopigia</i> <i>Musca domestica</i> (на закрито)
август	<i>Lucilia sericata</i> <i>Lucilia caesar</i> <i>Chrysomia albiceps</i> <i>Lucilia ampullacea</i> <i>Calliphora vicina</i> <i>Calliphora vomitoria</i>

	<i>Muscina stabulans</i> <i>Eudasyphora sp.</i> <i>Sarcophaga Lyopigia</i> <i>Musca domestica</i> (на закруто)
септември	<i>Calliphora vicina</i> <i>Lucilia sericata</i> <i>Chrysomia albiceps</i>
октомври	<i>Calliphora vicina</i> <i>Chrysomia albiceps</i> <i>Lucilia caesar</i>
ноември (само в серия топли дни)	<i>Calliphora vicina</i> <i>Calliphora vomitoria</i>
декември (само в серия топли дни)	<i>Calliphora vicina</i> <i>Calliphora vomitoria</i>

Данните от есенно-зимното експериментално изследване потвърждават общите литературни данни за мухите от вида *Calliphora vomitoria*, но дават нови екологични и съдебно-ентомологични факти, които са уникални и важни за практиката. Нашите данни разкриват много по-дълъг период на развитие при ниски температури, отколкото посочения при по-рано публикувани данни (59 дни, Marchenko, 2001) за вида *Calliphora vomitoria*. Дълги етапи от развитието са при температури под долния температурен праг на развитие LDT за вида и дори при отрицателни температури, достигащи до -19°C . Въпреки този факт се наблюдава отлична преживяемост и успешно се излюпват зрели индивиди 160 дни след овипозицията.

Комбинацията от метаболизма на микробите и агрегацията на ларвите на мухи в трупа повишават локалната температура до $0 + 2^{\circ}\text{C}$ при околни температури ниско под нулата. Ларвените маси и микробната активност създават условия вътре в трупа, които значително се различават от околната среда. Температурата на трупа има съществен ефект върху развитието на трупните насекоми, тъй като вътрешната температура на трупа може значително да надвиши околната температура (Catts, 1992; Introna et al., 1989). Докато при високи температури насекомите са застрашени от загуба на течности, при температури под нулата насекомите се конфронтират с очевидното предизвикателство на потенциалното формиране на лед в тялото им. При пойкилотермните същества с дребно тяло, съдържащо около 70% вода, при ниски температури това наличие на вода и нейната обмяна създава критични обстоятелства. В тези случаи, първа „линия на защита”, дори за насекомите в студените региони, е поведенческа реакция – реакция, която насочва презимуващото насекомо към термично-буферирана микросреда. Освен избор на термално-удобна обстановка, насекомите могат да притежават забележително съчетание от физиологични механизми за предотвратяване на увреждания от ниски температури. Диапаузата е форма на спиране на развитието, често срещана при презимуващи насекоми, каквито са трупните мухи. Дискутабилен е въпросът, как ларвите на мухите избягват излагането на екстремно ниските зимни температури – чрез повишаване на температурата локално в

трупа от активност на ларвените маси, или чрез специфични физиологични промени (студов толеранс, синтез на глицерол). Концентрацията на глицерол и студовият толеранс нарастват прогресивно при ниски температури на околната среда и температури на инкубация (Chen and al. 1987; Lee, 1989). Този факт може да има значение при определяне на постморталния интервал (PMI) при криминални разследвания.

Експерименталният резултат в нашия случай се потвърждава и от реален случай от практиката с другия студоустойчив вид – *Calliphora vicina* (СМ-4/2010) – ларвени маси в трупа, преживяващи минусови температури и снежно-ледена покривка.

Denno and Cothran (1976) отбелязват, че цикълът на развитие на трупните мухи (калифориди) и развитието на ларвите им са първоначално забавени поради по-дълъг период на развитие на яйцата в сравнение с други видове. По-студените температури през нощта се отразяват на по-нататъшното забавяне на развитието на яйцата и ларвите при трупните мухи *Calliphoridae*. ***Calliphora vomitoria* и *C. vicina* са видове, типични за по-студено време и са преобладаващи през есенните и ранните пролетни месеци.** Видовото разнообразие в различни географски локализации през различните сезони и специфичните ефекти на температурата върху развитието на насекомите, са необходими фактори за оценка при приложение на ентомологичните данни за определяне времето на настъпване на смъртта (Anderson, 2000a).

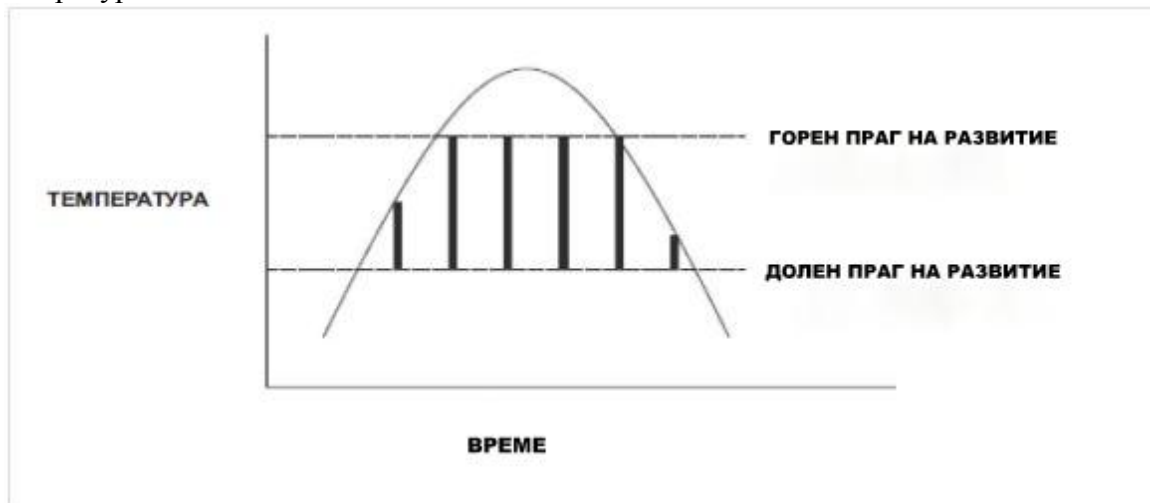
Методика за изчисление на постморталния интервал въз основа на ентомологични данни от развитието на мухите върху трупа

Нашето изследване би останало само ентомологично, ако не се прилагаше в съдебномедицинската практика. Именно това приложение на *Diptera* показва значението на съдебната ентомология за определянето давността на смъртта в случаи, когато други методи са безсилни. Определянето на възрастта на развиващите се върху трупа ларви на мухи осигурява намирането на минималния постмортален интервал, защото (при много малко изключения), възрастните мухи не снасят яйца върху жив гостоприемник. Дори в най-консервативната си форма този подход не определя максималния постмортален интервал, тъй като може да има неизвестен период от време между смъртта и полагането на яйца или ларви върху тялото (например при първоначално скриване и упаковане на тялото и последващото му изхвърляне далеч от мястото на смъртта). В зависимост от вида на насекомите и условията на местопроизшествието, степента на развитие може да посочва постмортален интервал в границите на по-малко от ден до повече от 1 месец (Smith, 1986).

На първо място, при определяне давност на смъртта (PMI), трябва да е точно фиксирано времето на изнемване на живите и консервирани образци от насекоми от трупа на местопроизшествието или от аутопсионната зала. Този момент е ключов за всички последващи изчисления и неточността при крайния резултат може да се дължи на неточност във фиксирането на първоначалния момент.

Спазването на точните стандартни процедури за начина на събирането на образците и събирането на метеорологични данни е задължително, за да може данните да се сравняват с референтни източници в началото на калкулацията. Инкубирането на живите ларви до момента на излюпване на възрастни мухи трябва също така да

отговаря на тези критерии и да са точно фиксирани времевите моменти е температурните данни.



Използва се линеен модел на отразяване на развитието с повишаване нивото на същото с нарастване на околната температура. **Приема се, че развитието спира под нивото на минималния (долен) температурен праг на развитие (LDT), а при достигане и преминаване на максималния (горен) праг на развитие, продължава със същото темпо.** Линеиният модел се нарича още модел на акумулираните градус-дни (ADD), защото развитието се изчислява като сума от температурите над долния температурен праг на развитие във времето. Например, 7 градуса над долния температурен праг на развитие за 3 дни представлява 21 акумулирани градус-дни (7x3 ADD). Сумираният брой от градус-дните се асоциира с конкретен специфичен стадий на развитие като излюпване на яйцето, приманаване през стадии на ларва, какавидиране, до излюпване на зряло насекомо. Цифрите са специфични за всеки вид.

$$ADD = T - LDT$$

където T е средната дневна температура и LDT е видово-специфичният долен праг на развитие. Сумират се данните за всички дни и се получава топлинната константа за вида ADD. Такава топлинна константа е изчислена за всеки вид.

След като знаем за кой вид муха правим определянето, се взема референтната цифра за акумулираните градус-дни и ретроградно се определя сумата от температурите над долния праг за развитие за всеки ден назад, до предполагаемата точка нула – първият ден на развитие (често съвпадащ с момента на настъпване на смъртта). За това са необходими температурни данни за определен период от време, обхващащ предполагаемите дати на престъплението. Колкото температурните замервания след изземване на образците и метеорологичните данни за периода преди това са по-точни и редовни (най-добре на всеки час), толкова по-точни резултати получаваме. Ако данните са от най-близката метеорологична станция, следва да се направи корелация между тях и температурни данни от местопроизшествието, замерени за определен период след огледа, за да имаме по-голяма точност. Понякога при сложен терен има съществени разлики в температурите между две точки с близка локализация (същото се отнася и за температури в закрити помещения).

При изчисленията трябва да се вземат предвид множество влияещи фактори – повечето референтни данни за развитието на отделни видове са на база лабораторни експериментални условия, при постоянни температури и различни степени на редуване на тъмна-светла фаза, на различни хранителни среди. В живота насекомите се развиват

при флукутиращи дневни температури и естествена смяна на осветеност ден-нощ, на естествена хранителна среда и пространство. Различните видове се повлияват по различен начин от тези фактори и трябва да се вземат предвид корекциите, които са необходими. Също така има нужда от повече експериментални изследвания в близки до реалните условия. Нашият експеримент е максимално близък до естествените условия – развитие върху труп на открито, с последващо лабораторно инкубиране върху подобна хранителна среда, при флукутиращи денонощни температури и естествено редуване на осветеност ден-нощ, с почасово замерване на температурата.

Факт е, че повече и по-прецизна референтна информация има събрана за селскостопанските насекоми-вредители, отколкото за видовете със съдебномедицинско значение поради логична целесъобразност. Съществува критична нужда от цялостна информация за развитието, стадияте, температурните прагове и акумулираните градус-дни, свързани с тях, за всички основни видове насекоми, които са важни от съдебномедицинска гледна точка. Понастоящем съществуват предимно лимитирани данни и са определени температурни параметри само за някои видове на база ограничен брой изследвания. Работата на Kamal (1958) върху температурните прагове на развитие на тринадесет вида трупни мухи е била дълго стандартна база от референтни данни в съдебната ентомология, въпреки някои аритметични грешки в тази публикация (Catts and Goff, 1992). Последващи изследвания включват работите на Nishida (1982), Reiter (1984), Виноградова и Марченко (1984), Nishida et al. (1986), Introna et al. (1989), Greenberg (1991), Byrd and Butler (1996), Anderson (2000), Marchenko (2001), Grassberger and Reiter (2001, 2002a, 2002b), Clarkson et al. (2004), Huntington (2005), и Nabity et al. (2006, 2007).

Установените от различните изследвания данни са ценен ресурс за определяне на потенциалните минимални времена на развитие в практиката. Същевременно съществува постоянна нужда тези данни да се обогатяват с повече параметри и стойностите да се прецизират. В допълнение, от голяма полза са проучвания за вариациите в тези параметри при географски различни популации на същите видове. Въпреки че е вярно твърдението, че „повечето учени предпочитат локално определените данни за развитието” (Catts and Goff, 1992), съдебноентомологичното общество трябва да стигне до консенсус относно температурите на развитие на съдебномедицински значимите видове и ако има съществени географски вариации в параметрите, тези вариации трябва да се определят количествено и да се вземат предвид за по-точни и достоверни изчисления.

За да бъдат нашите резултати достоверни при даване на експертно мнение в съда, необходимо е да бъдат спазени т.нар. правила на Дауберт (Daubert): 1. Методиката (техниката) да е тествана при реални полеви условия, а не само в лаборатория. 2. Методиката да е била обект на референтен преглед и публикация. 3. Какво е известно за нивото на грешни резултати? Дали е статистически равно на нула, или близко до нулата? 4. Съществуват ли стандарти за контрол на приложението, наличен ли е професионален опит и използване на модел? 5. Методиката общопризната ли е в съответната научна общност? (последното е било единственият по-рано признат критерий по Frye)

В един от последно публикуваните обзори на експерименталните изследвания с трупен модел в съдебната ентомология (Tomberlin et al., 2012) са разработени 13 критерия въз основа на 75 проучени подобни изследвания. Критериите са нужни, за да се стандартизират методиките и за да има закономерна повтораемост на търсените резултати, свързани с определянето на минимален постмортален интервал. Това би довело в бъдеще до конвертируемост на изследванията и до възможността те да бъдат

статистически оценявани и сравнявани. До момента се наблюдава голяма разнородност по всички критерии в преобладаващата част от проучванията по света. Изброените критерии са следните:

1. Вид животински модел
2. Време на реално настъпване на смъртта на модела
3. Метод за евтаназия
4. Метод за съхранение
5. Време на съхранение (преди поставяне на място)
6. Време за пренасяне от мястото на съхраняване до мястото на експеримента
7. Време на деня, през което останките се поставят на място
8. Каталог на членестоногите, асоциирани с останките през периода
9. Време на първоначалния контакт с насекоми
10. Време на първата колонизация (овипозиция)
11. Място на проучването
12. Брой на труповете
13. Месец и сезон на проучването

Като изключим човешкия труп като идеален модел, свинските трупове са най-добрият и проучен вид модел. Целесъобразно е животното да се убива по стандартизиран начин непосредствено преди поставяне на тялото на мястото на експеримента. Между момента на убиване и поставянето на трупа на мястото на експеримента трябва да има по възможност минимално време. В този период то трябва да се съхранява изолирано от околната среда (пакетирано). Най-добре е останките да се поставят на място сутрин, за да се зачита цял ден в рамките на експеримента. По възможност (това зависи от опита и броя на експериментаторите и сътрудниците) да се съставя пълен каталог на всички насекоми от мястото на експеримента. Добре е да се наблюдава внимателно и да се документират както първата поява на трупни насекоми на мястото, така и първото им снасяне на яйца или ларви по трупа. Мястото на проучването трябва да е добре описано (сянка, открито, гора, поляна, растителност), от значение е да се правят експерименти в региони, където преди не са правени.

В нашия случай експериментът отговаря добре на тези критерии и те са изпълнени в рамките на възможното по най-добрия начин. Поставя се началото на изследвания, които да продължат и в бъдеще и да бъдат сравними с подобни на тях както у нас, така и в други страни.

6. Заклучение с изводи

В заключение могат да се направят следните изводи:

- 1) При проведените експерименти се идентифицираха най-значимите от съдебномедицинска гледна точка видове мухи, свързани с разложението на човешки трупове – *Calliphora vicina*, *Calliphora vomitoria*, *Lucilia sericata*, *Lucilia caesar* и *Chrysomya albiceps*. Експериментите са проведени в географския регион на област Габрово, България.
- 2) Събраха се данни и се идентифицираха и други видове мухи, които се срещат по-рядко върху човешки трупове. Те също имат значение и могат да се използват в практическата ентомологична експертиза.
- 3) Определиха се най-типичните за сезона и климатичните условия видове мухи – за всеки месец от годината според екологичните им особености – на открито и закрито, при по-високи и при по-ниски температури.
- 4) Калкулираха се температурните данни за всички значими видове трупни мухи, които са база за изчисляване на постморталния интервал при реални случаи от практиката.
- 5) Тези температурни данни в повечето случаи съответстват на референтни данни от други експерименти, публикувани в литературата. Разликите в някои варианти се обясняват с вариации на географската популация, особености по време на всеки експеримент – денонощни амплитуди на околните температури, температури на ларвените маси, количество на валежите, влияние на конкурентни видове, лабораторни или полевни условия и т.н. Такива са обясненията и на други автори.
- 6) Начинът на провеждане на експериментите съответства на международните стандарти и изисквания за конвертируемост на резултатите и са добра основа за следващи изследвания и сравнения.
- 7) Установяват се необичайни и непубликувани досега способности на ларвите на мухи от видовете *Calliphora vomitoria* и *Calliphora vicina* за преживяване при много ниски околни температури през зимата – до -20°C . – Това бе наблюдавано при експеримента и при реален случай. Тази уникална особеност се обяснява с физиологичните особености на тези характерни за студените сезони видове, както и със способността им да генерират телесна топлина в ларвената маса. Този факт е от съществено значение при съдебномедицинска експертиза на трупове от тези сезони, особено от късна есен, намерени през зимата или в края на зимата.
- 8) Изготвените протоколи за събиране на ентомологични образци от местопроизшествието (идентични с европейските стандарти) дават възможност за въвеждане в практиката на съдебно-ентомологичните методи, като се намаляват до минимум вероятностите за грешки поради малък опит. В тях по най-прост и достъпен начин се дава методологията на разследващите и на експертите на местопроизшествието как да описват находката, как и къде да се събират образци и по какъв начин да ги обработват и транспортират до даването им на специализиран експерт-ентомолог.
- 9) Съществуват множество проблеми при използването на ентомологични доказателства за установяване давността на смъртта. Има голямо

количество вариации във факторите на околната среда, даващи основание за повишено внимание при използване на методиките и показващи нуждата от нови изследвания. Доброто познаване на тези особености и повишаването на опита в тази област ще осигурят по-високо качество на съдебно-ентомологичната и съдебномедицинска експертиза.

- 10) Придобитият опит и получената специфична квалификация дават възможност за прецизна таксономична идентификация на всички значими от съдебномедицинска гледна точка видове мухи, събрани при експериментите и от реални случаи. Като резултат може да се изготвя съдебно-ентомологична експертиза за нуждите на съдебномедицинската практика.

7. Приноси

I. Оригинални приноси

- Това е първото по рода си експериментално изследване в областта на съдебномедицинската ентомология, проведено на територията на Република България.
- Досега в България въпросите на съдебна ентомология не са разработвани.
- Проведените експерименти въвеждат в съдебномедицинската практика в България ентомологична методика, която единствена прави възможно определяне давността на смъртта в късния послесмъртен период, при разложени и дори скелетирани трупове.
- Идентифицираните популации трупни мухи в географския регион на България са уникални и значими за съдебномедицинската практика и за зоогеографията.
- Разработени са и са приведени в съответствие с българските изисквания стандарти и правила за съдебно-ентомологично изследване и експертиза (на основата на европейските стандарти и правила) и се предлагат стандартни протоколи за събиране на ентомологични доказателства от местопроизшествието.

II. Потвърдителни приноси

- Получените данни при експерименталното изследване са в синхрон с литературните данни относно температурните коефициенти за развитие при изследваните видове мухи.
- Установените при изследването видове мухи в региона съвпадат със съдебномедицински значимите видове мухи, определени за Европа на база на изследвания в другите държави.

8. Списък с оригинални публикации по темата:

1. **Kolev Y.** Forensic entomology – from history to contemporary standards of practical application. [in Russian] Materialele conferintei a II-a medicilor legisti din Republica Moldova, 2006 Bavat Print, Chishinau, Moldova, 155-163. (Судебная энтомология – от истории к современным стандартам практического приложения – в научен сборник, Кишинев, Молдова, 2006).
2. **Kolev Y., Radoinova D.** An initial study of a colonization of a pig carrion by insects as forensic indicators for a time since death. *Trakia Journal of Sciences*, Vol. 6(2), supl. 2, 2008, 23-25.
3. **Kolev Y., Radoinova D.** Using pig carrion as an experimental model for a human body in forensic entomology succession study – a methodology. *Acta morphologica et anthropologica*, Sofia, BAS, Vol. 15, 2010, 155-158.
4. **Колев Я. Г.** „Съдебно-ентомологично изследване” (на руски език) - глава в Ръководство по съдебна медицина за специалисти по съдебна медицина, Москва, Русия, под ред. на чл. кор. РАМН проф. д-р Ю. Пиголкин, завеждащ Катедра по съдебна медицина в Московската Медицинска Академия „И. М. Сеченов” – гр. Москва, Русия. (под печат)

Списък на участия с доклади и лекции по темата в научни форуми:

1. **Kolev Y., Radoinova D.** Forensic entomology and its application – a starting point for the geographical region of Bulgaria. *Papers of the 5-th congress of Balkan Academy of Forensic Sciences /BAFS/, Ohrid, Macedonia, 3-7 June 2007*
2. **Колев Я.** Приложение на съдебномедицинската ентомология при криминални разследвания – национална конференция на съдебните лекари – Габрово, 19-20 октомври 2007
3. **Kolev Y., Radoinova D.** A case of blowfly larval hibernation on pig carrion during an autumn-winter succession study. *Papers of the 5-th meeting of the European Association for Forensic Entomology /EAFE/, Crete, Greece, 20-24 May 2008*
4. **Колев Я., Радойнова Д.** Използване на свински труп като експериментален модел на човешко тяло при съдебно-ентомологично изследване: методология. III Копривщенски морфологични дни на БАН, VII Национална конференция по антропология, 30 май – 1 юни 2008, Копривщица
5. **Kolev Y., Radoinova D.** Three cases of use of insects during medicolegal investigation of death in Bulgaria. *Papers of the XXI Congress of the International Academy of Legal Medicine, 28-30 May 2009, Lisbon, Portugal*

6. **Kolev Y.,** Radoinova D. The use of forensic entomology during medicolegal investigation of death – different aspects. Papers of the VI annual meeting of the Balkan Academy of Forensic Sciences /BAFS/, 18-21 June 2009, Kavala, Greece
7. **Kolev Y.,** Radoinova D. Forensische Entomologie in Bulgarien – Vier Fallbeispiele. Rechtsmedizin, 2009, 19(4) p.304 - Papers of the 88 Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, 22-26 September 2009, Basel, Switzerland
8. **Kolev Y.,** Radoinova D. The use of forensic entomology in Bulgaria – from experiments to practice. Papers of the meeting of the European Association for Forensic Entomology (EAFE), 7-10 September 2010, Murcia, Spain
9. **Kolev Y.** Forensic entomology and its implication and importance in crimescene investigation. Invited lecture at the Osteuropa-Verein and Romanian Society of Forensic medicine international symposium, 23-26 June 2011, Tirgu Mures, Romania (водеща лекция)



ПРОТОКОЛ ЗА СЪБИРАНЕ НА ЕНТОМОЛОГИЧНИ ОБРАЗЦИ ОТ МЕСТОПРОИЗШЕСТВИЕТО

Събрани от: _____ дата/час: _____ случай № _____

Спецификации на трупа:	
Възраст: _____	Пол: _____
Височина: _____	Тегло: _____
Позиция: погребан <input type="checkbox"/> (определена дълбочина: _____) на повърхността <input type="checkbox"/>	
лежащ <input type="checkbox"/>	висящ <input type="checkbox"/> (в контакт с повърхността) <input type="checkbox"/>
във вода <input type="checkbox"/>	
забележки: _____	

Облекло: изцяло облечен <input type="checkbox"/> частично облечен <input type="checkbox"/> гол <input type="checkbox"/>	
тялото покрито <input type="checkbox"/> със _____	
забележки _____	

Степен на разложение: пресен <input type="checkbox"/> начално разложение <input type="checkbox"/>	
напреднало разложение <input type="checkbox"/> скелетиран <input type="checkbox"/>	
забележки _____	

Белези от хищници и мършояди *: _____	
Рани *: _____	

Място на смъртта (местопроизшествие)	
На открито: Гора <input type="checkbox"/> Поляна <input type="checkbox"/> Пасище/ливада <input type="checkbox"/> Храсталак/шубрак <input type="checkbox"/>	
Обществен парк <input type="checkbox"/> върху трева/почва <input type="checkbox"/> върху твърдо покритие/облицовка <input type="checkbox"/>	
Сграда: Гараж/склад <input type="checkbox"/> Помещение за животни <input type="checkbox"/> Обитаема жилищна сграда <input type="checkbox"/> Вила <input type="checkbox"/>	
Повърхност (килим, паркет, др.): _____	
Каква стая: _____ отопляема <input type="checkbox"/> отворен прозорец <input type="checkbox"/>	
Различна обстановка (например автомобил): _____	
забележка _____	

Температури t°C	
околна 1 (2 метра над земята): _____	околна 2 (5см над земята): _____
Телесна повърхност: _____	Ако има, на ларвената маса 1*: _____ ларвена маса 2*: _____
ларвена маса 3*: _____	Пространство между тялото и настилката: _____
Почва (на дълбочина около 20см): _____	Вода: _____

Измерете и запишете въздушната (околната) температура на местопроизшествието в продължение 5-10 дни след откриването на тялото!

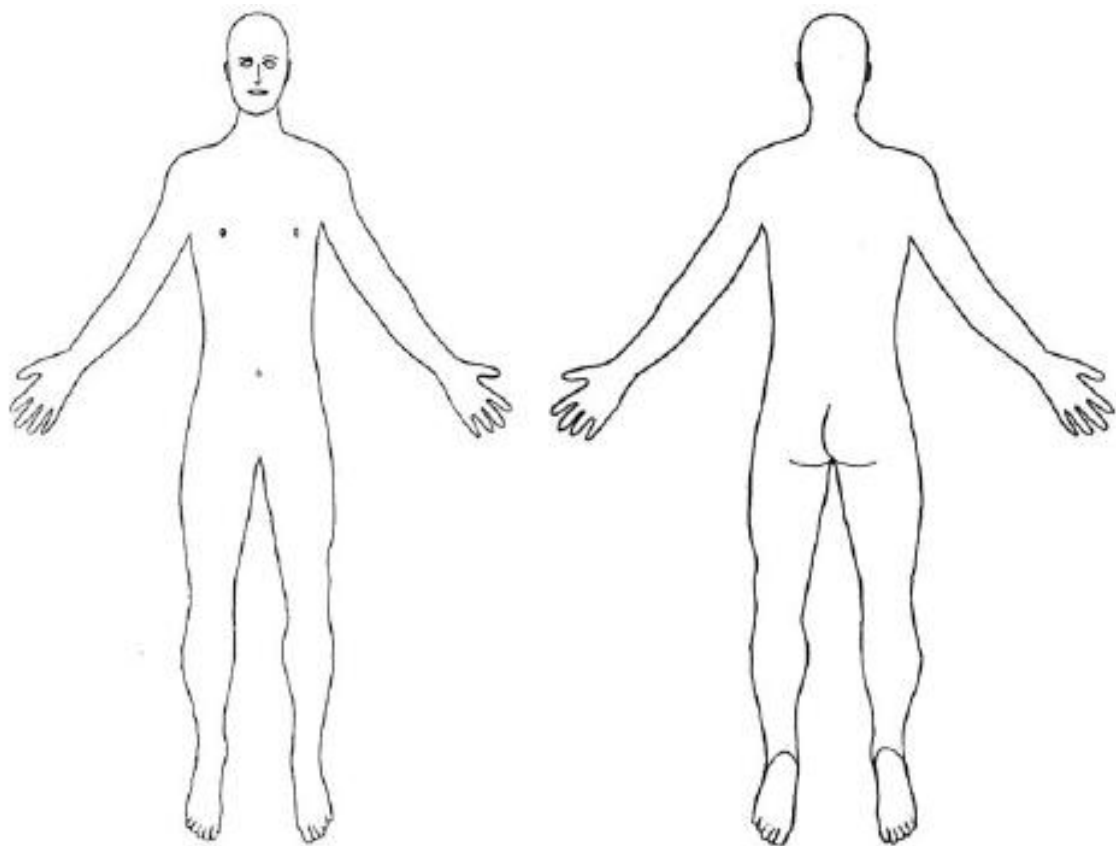
* моля отбележете позициите върху схемите на тялото

Протокол за събиране на ентомологични образци от местопроизшествието (лист 2)

Събрани от: _____ дата/час: _____ случай № _____

Моля, използвайте тази схема за отбелязване на:

- частично облекло (щриховано)
- следи от хищници и мършояди (M————>)
- рани (P————>)
- ларвени маси (ЛМ₁, ЛМ₂,... ———>)
- локализация на образците (1,2,3,...)



Протокол за събиране на ентомологични образци от местопроизшествието (лист 3)

Събрани от: _____ дата/час: _____ случай № _____

Легенда: L = ларви P = какавиди AF = възрастни мухи AB = възрастни бръмбари E = празни какавиди				
Образец №	Приблизителен брой	Тип иззети образци (ларви, зрели насекоми, др.)	конс./живи <input type="checkbox"/> a	Локализация по тялото*
1		L <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> AF <input type="checkbox"/> AB <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/>		
2		L <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> AF <input type="checkbox"/> AB <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/>		
3		L <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> AF <input type="checkbox"/> AB <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/>		
4		L <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> AF <input type="checkbox"/> AB <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/>		
5		L <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> AF <input type="checkbox"/> AB <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/>		
6		L <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> AF <input type="checkbox"/> AB <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/>		
7		L <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> AF <input type="checkbox"/> AB <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/>		
8		L <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> AF <input type="checkbox"/> AB <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/>		
9		L <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> AF <input type="checkbox"/> AB <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/>		
10		L <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> AF <input type="checkbox"/> AB <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/>		
11		L <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> AF <input type="checkbox"/> AB <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/>		
12		L <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> AF <input type="checkbox"/> AB <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/>		
13		L <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> AF <input type="checkbox"/> AB <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/>		
14		L <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> AF <input type="checkbox"/> AB <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/>		

конс. = умъртвени и консервирани в алкохол насекоми

a живи = затворени в контейнери живи, например за последващо инкубиране (alive)

* моля, отбележете позициите върху схемите на тялото

Пояснения: образците от насекоми се събират ръчно, с ръкавици или пинсети, по възможност от всички места поотделно, с описание и отбелязване както върху схемата, така и върху контейнерите с образци на съответните номера, дата, номер на случай. Насекомите и техните ларви се умъртвяват чрез краткотрайно поставяне във почти вряла вода или за около 1 час във фризер при – 20°C, след което се консервират в 70-95% етанол (етилов алкохол). Това трябва да се извърши ако не на местопроизшествието, то много скоро след огледа. Живите образци (ларви от мухи за инкубиране) се поставят във вентилирани контейнери, които може да са частично напълнени с дървени трици. Иззема се и почва близо до трупа, до дълбочина от около 10-20см (в която може да има какавиди). Образците се изпращат възможно най-скоро на експерта, който да ги идентифицира/инкубира. За въпроси и подробни обяснения: e-mail: drforensic@mail.bg моб.+359888631192 – Д-р Янко Колев

Протоколите са изготвени в съответствие с Европейските стандарти, утвърдени от EAFE, 2006.

10. Summary

Yanko G. Kolev, MD

Department of Forensic Medicine, District Hospital MBAL, Gabrovo, Bulgaria

Use of *Diptera* in forensic-entomological determining the time since death in Bulgaria

PhD thesis, presented at Medical University of Varna, Varna, Bulgaria

Supervisor:

Dobrinka D. Radoinova, MD, PhD, Division of Forensic medicine and deontology, Department of General and clinical pathology, forensic medicine and deontology, Medical University of Varna, Varna, Bulgaria

ABSTRACT

Forensic entomology has become relatively common in criminal investigations all over the world, but gaps in knowledge of local dipteran taxonomy and ecology have become apparent. The use of flies in forensic entomology in postmortem interval estimations is hindered by lack of information of local species in Bulgaria. A basic distribution data for the most indicator species of insects are required. It is apparent that the seasonality and species assemblage vary in different geographical areas. For accurate postmortem interval estimations using flies, the most important information is the species identity of the immature flies found upon a corpse and their temperature-biased developmental times.

The major goals of this study are: 1) to determine and to identify the most indicator species of flies of forensic interest, associated with a pig carrion (as a model of human cadaver in the region of Gabrovo, Bulgaria, for each season of the year and 2) to collect data on temperature dependent development and to calculate the times of development of the key species of flies growing at different temperatures during the four seasons for the later use in the determination of the postmortem interval and 3) to make simple and easy for use field protocols for the collection of entomological evidence at crimescene.

Seasonal carrion decomposition studies were conducted in the suburban area of Gabrovo, Bulgaria. In 2007 the first field experiments started, using a piglet corpses for successional studies on insect colonisation. There were performed 4 studies - a spring, summer, autumn-winter and a summer experiment again (2008). Domestic pig carcasses (N=4) were placed in the study site. Carcasses were monitored during the decay process to document the temporal variation in decay patterns and the composition of the associated carrion fly communities, together with the temperatures of their development from immature stages to adult flies. The insects were collected and are in process of full identification. Forensically important species of flies (*Calliphora vicina*, *Calliphora vomitoria*, *Lucilia sericata*, *Lucilia caesar* и

Chrysomia albiceps) were determined for the geographical region. Their temperature-dependent times of development were calculated. A research on their specific ecological data and seasonal patterns for the region reported. Interesting new facts about the survival of the fly maggots (*Calliphora vomitoria* and *Calliphora vicina*) during winter under-zero temperatures were discovered meanwhile. Field protocols for the collection and processing of entomologic specimens from the crime scene were made, according to the EAFE standards.

This work is the first replicated decomposition study in Bulgaria and contributes to a development of a national database in forensic entomology. The first cases (a few of them presented) involving the use of insects were solved and the corresponding to experimental data results gave hopes to the future of the discipline and to lay down its statute at national level.

It is important to introduce the basic knowledge of methods and applications of the science among all professionals involved in a death investigation. Only the good collaboration and a clear procedure can lead to a full understanding of all the evidence recorded at the crime scene and at the autopsy.

11. Благодарности:

- На моя научен ръководител доц. д-р Добринка Радойнова благодаря за искрената и приятелска помощ и за постоянството да ме подтиква да доведе до край този труд
- На д-р Вили Доков и д-р Иван Стоянов за това, че ме подкрепяха през тези години и ми повтаряха, колко е важно да разработя тази тема за българската съдебна медицина
- На всички останали колеги – съдебни лекари, които се интересуваха от моята работа и ми даваха стимул да им покажа резултати
- На Jens Amendt от Института по съдебна медицина в гр. Франкфурт на Майн – Германия за помощта и положителните емоции, от които кипи
- На Krzysztof Szpila и Andrzej Grzywacz - ентомолози от Университета Николаус Коперник в Торун – Полша, които талантливо ме научиха да идентифицирам мухи и техните ларви и това ми даде възможност за завърша работата си
- На Борислав Георгиев от Института по зоология към БАН, който доброволно ми помагаше при идентификация на част от видовете
- На проф. д-р Петър Берон, от когото научих, че при проучването на погребението на цар Калоян са използвани останките от мухи
- Накрая, но не на последно място, на моето семейство – съпругата и синовете ми, които през всичките тези години ме подкрепяха и ми помагаша търпеливо, дори със събирането на буболечки...