

## Forensische diergeneeskunde: het haar-ID-project, een opdracht voor SherLOCK

*Veterinary forensics: the hair ID project, an assignment for SherLOCK*

S.I. Galjé, A. Decostere, K. Chiers, L. Van Brantegem

Vakgroep Pathobiologie, Farmacologie en Bijzondere dieren, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent, Salisburylaan 133, 9820 Merelbeke

Shirell.galje@gmail.com  
Leen.VanBrantegem@ugent.be

### SAMENVATTING

Tot op heden is er geen éénduidige methode die als gouden standaard wordt gebruikt bij het lichtmicroscopisch identificeren van haren van verschillende diersoorten. Deze studie had als doel twee haarpreparatieprotocollen voor lichtmicroscopische haaridentificatie op punt te stellen. Op basis daarvan werd gestart met het opstellen van een haaratlas die in de toekomst gebruikt kan worden als naslagwerk wanneer er nood is aan diersoortidentificatie op basis van haarmorfologie. Er werden 152 haren van dertien verschillende diersoorten onderworpen aan twaalf verschillende preparatiemethoden, die nadien beoordeeld werden met behulp van vooraf gedefinieerde criteria. Op basis van de testresultaten werden twee uitgewerkte protocollen opgesteld: één voor de methode met Aquatex en één voor de methode met transparante nagellak. Met behulp van deze methoden konden haren van konijnen, reeën en schapen relatief eenvoudig microscopisch gedifferentieerd worden van de andere bestudeerde diersoorten. Om zeker te zijn dat deze kenmerken ook diersoortspecifiek zijn, moet er echter bijkomend onderzoek worden uitgevoerd.

### ABSTRACT

To date, there is no gold standard method for light microscopic hair identification of different animal species. The aim of this study was to develop two hair preparation protocols for light microscopic hair identification and to use this as a foundation to initiate the development of a hair atlas. This atlas can be used in the future as a reference when there is a demand for species identification based on hair morphology. One hundred fifty two hairs from thirteen different animal species were subjected to twelve different preparation methods, which were then reviewed following predefined criteria. Based on the test results, two protocols were drawn up: one for the method with Aquatex and one for the method with transparent nail polish. Using these methods, rabbit, deer and sheep hairs could be microscopically differentiated relatively easily from the other animal species in the study. However, to ensure that these characteristics are also species-specific, additional research must be conducted.

### INLEIDING

Forensisch haaronderzoek behelst het analyseren en identificeren van haren. Door haren te identificeren tijdens forensisch onderzoek, kan worden aangetoond of een dier of mens al dan niet in contact is geweest met een dier, een mens of een locatie (Oien, 2009). Identificatie van haren kan gebeuren op basis van DNA-onderzoek of op basis van haarmicroscopie.

DNA-onderzoek kent twee soorten testen: testen waarbij gebruik gemaakt wordt van nucleair DNA en

testen waarbij gebruik gemaakt wordt van mitochondriaal DNA (Deedrick en Koch, 2004b; Bekaert et al., 2012; Melton et al., 2012; Brandhagen et al., 2018; Syndercombe-Court, 2021). Momenteel wordt nucleair DNA-onderzoek gezien als de gouden standaard voor het identificeren van (dier)soorten op basis van haarstalen (Lynch, 2003; Pilli et al., 2014).

Bij nucleair DNA-onderzoek wordt een DNA-staal genomen ter hoogte van de haarwortel, aangezien enkel daar nog celkernen aanwezig zijn. De staalname van nucleair DNA is onmogelijk op het moment dat

de haarwortel ontbreekt, of wanneer er geen celkernen meer in de wortel aanwezig zijn. Om de celkernen te visualiseren kan gewerkt worden met een fluorescerende kleurstof, 4'-6-diamidino-2-fenylindole, die vooral aan chromatine bindt en een fluorescentiemicroscop (Bourguignon et al., 2008). Bijkomende nadelen van nucleaire DNA-testen zijn de hoge kostprijs en de vereiste dat er voldoende DNA-materiaal in het haar aanwezig is om de test uit te voeren (Kowalski et al., 2004).

Mitochondriaal DNA-onderzoek kan worden toegepast op haren die niet geschikt zijn voor nucleaire analyse, door degradatie, het gebrek aan celkernen of het ontbreken van de wortel. Er kan over bijna de gehele lengte van de haarschacht een mitochondriaal DNA-staal worden genomen. Mitochondriaal DNA-onderzoek heeft echter ook beperkingen, aangezien met deze techniek enkel kan geïdentificeerd worden op groepsniveau (gedeelde maternale afkomst) en niet op het niveau van één specifiek individu (Syndercombe-Court, 2021).

Haaridentificatie met behulp van een lichtmicroscop is gebaseerd op het morfologisch vergelijken van haren van onbekende oorsprong met haren van bekende oorsprong (Hicks, 1977). Het voordeel van lichtmicroscopische haaridentificatie is dat eender welke haren onderzocht kunnen worden en niet enkel degene die voldoende DNA bevatten. Daarnaast ligt de kostprijs lager daar er enkel standaard aanwezige laboratoriumapparatuur, zoals een lichtmicroscop, draagglazjes en media, nodig is om het onderzoek uit te voeren. Om tot een betrouwbare conclusie te komen, dient de onderzoeker echter veel ervaring te hebben met het microscopisch beoordelen van haren en dient deze toegang te hebben tot een goede data-

base ter vergelijking van het haar in kwestie (Pilli et al., 2014). Ook moet de onderzoeker een goede kennis hebben van de verschillende haarsoorten en de haaranatomie en wordt in het beste geval enkel info over diersoort of eventueel ras verkregen (Oien, 2009).








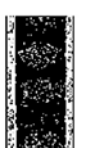



### HAARSOORTEN EN HAARANATOMIE

Haren zijn epidermale structuren die voorkomen bij zoogdieren (Wandhare en Bhosale, 2017; Senthilkumar et al., 2018). Zoogdieren hebben verschillende soorten haren die behoren tot de ondervacht, de dekharen of de tasharen (Deedrick en Koch, 2004a). Bij specifieke diersoorten waaronder lama's, schapen en paarden zijn er ook nog andere haren, zoals staartharen, manen en wolharen aanwezig (Deedrick en Koch, 2004a; Chattha et al., 2011).

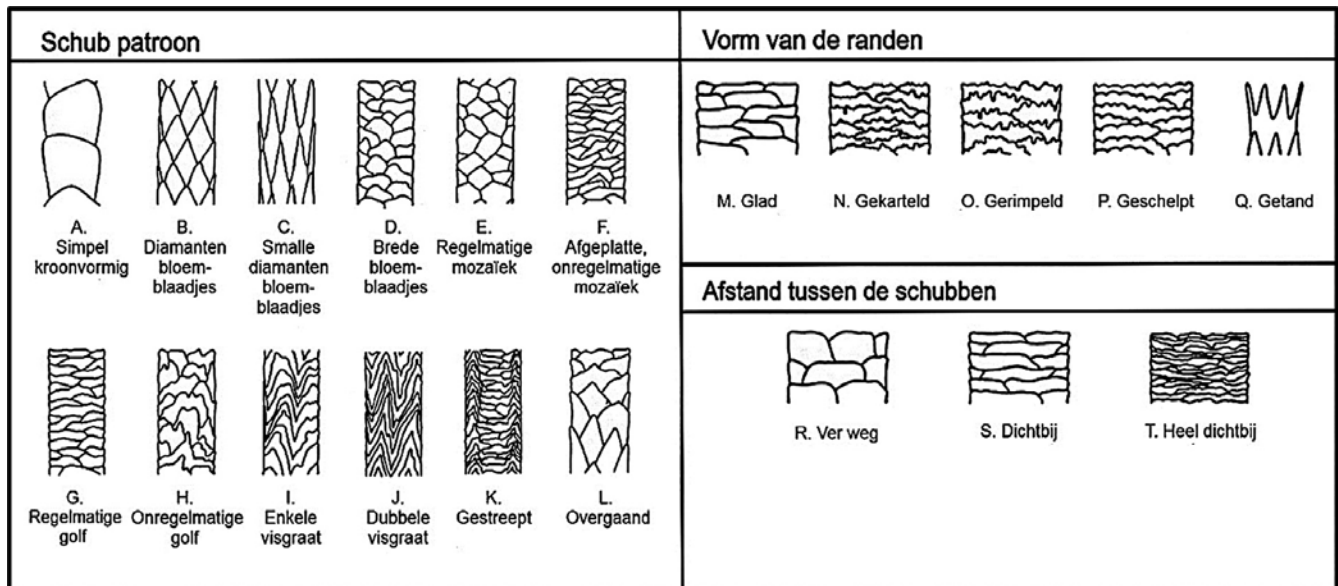
Dekharen zijn de belangrijkste haren met betrekking tot identificatie, waarbij het haar kan worden opgedeeld in een schede, transit en een schild. De schede bevindt zich aan de basis van het haar en loopt via een transitregio over in het schild naar de haarpunt toe (Teerink, 1991).

Microscopisch bestaat een haar op doorsnede uit drie, morfologisch onderscheidbare structuren (Hicks, 1977; Ahmed et al., 2018; Senthilkumar et al., 2018). Van binnen naar buiten toe bekeken, bestaat een haar uit de medulla, de cortex en de cuticula.

De medulla is de binnenste laag van een haar. Binnen de medulla kan het medullair patroon beschouwd worden over de gehele lengte van de haarschacht, de structuur van de medulla en de vorm van de randen van de medulla (Hicks, 1977; Teerink, 1991; De Marinis, 2006; Wandhare en Bhosale, 2017; Sari en Ar-

Patroon	 <p>Continu</p>			 <p>Gefragmenteerd</p>		
Structuur	 <p>Amorf</p>	 <p>Uniseriate</p>	 <p>Multiseriate</p>	 <p>Filled lattice</p>	 <p>Gedeeltelijk filled lattice</p>	 <p>Gevacuoleerd</p>
Vorm van de randen	 <p>Onregelmatig</p>		 <p>Recht</p>		 <p>Geschelpt</p>	

Figuur 1. De verschillende patronen, structuren en randvormen van de medulla van haren (Uit: De Marinis en Asprea, 2006).



**Figuur 2.** De verschillende schubpatronen, randvormen en afstanden tussen de cuticulaschubben van haren (Uit: Brunner en Coman, 1974).

pacik, 2018) (Figuur 1). Daarnaast is er de medulaire index, die kan meebepalen of een haar afkomstig is van een mens, dier of om onderscheid te maken tussen honden en katten (Robertson, 1999). De medulaire index is de verhouding van de medulaire diameter ten opzichte van de diameter van de haarschacht, die wordt berekend door de diameter van de medulla te delen door de totale diameter van het haar (Mathiak, 1938; Robertson, 1999). Dieren hebben een medulaire index die, naargelang de diersoort en het ras, varieert tussen de 0,3 en 0,9. Bij de mens is de index altijd kleiner dan 0,3 (Robertson, 1999; Deedrick en Koch, 2004a; Wilson en Wheeler, 2008; Wandhare en Bhosale, 2017). De cortex is de middelste laag van een haar en is opgebouwd uit langwerpige, gekeratiniseerde cellen (Hicks, 1977; Sari en Arpacik, 2018). De cortex kan ook corticale fusi, pigmentgranulen en ovoïde lichaampjes bevatten (Deedrick en Koch, 2004; Oien, 2009). Bij de pigmentgranulen is het belangrijk om te kijken naar de kleur, grootte en vorm van de pigmenten, de pigmentdistributie en de concentratie van het pigment. De cuticula is de buitenste laag van een haar, die instaat voor de bescherming van de binnenste lagen (Teerink, 1991). Deze wordt gevormd door meerdere lagen dode cellen die elkaar overlappen, wat bij microscopisch onderzoek waargenomen wordt als een schubbenpatroon (Hicks, 1977; Chattha et al., 2011). De schubben volgen altijd de lengterichting van het haar, van de wortel naar de haarpunt toe. Het bekijken van het schubbenpatroon van de cuticula, de rand van de schubben en de afstand tussen de schubben speelt een belangrijke rol in het identificatieproces (Brunner en Coman, 1974; Hicks, 1977; Deedrick en Koch, 2004a; Sari en Arpacik, 2018; Ahmed et al., 2018) (Figuur 2).

## MOUNTING-METHODEN

Aangezien in dit studiegebied vaak gebruik gemaakt wordt van Engelse termen, werd ervoor gekozen deze in het verdere verloop van het artikel te hanteren.

Alvorens haren te kunnen bekijken onder de lichtmicroscop, moet er een *mounting*-methode worden toegepast. Dit is een manier van prepareren alvorens een haar wordt bekeken onder de microscoop. Tijdens dit proces worden de haren al dan niet permanent gefixeerd op een draagglasje. Er wordt daarbij een onderscheid gemaakt tussen *dry*- en *wet mounts*. Een *dry mount* is een *mounting*-methode zonder vloeistof, bij een *wet mount* wordt er wel vloeistof gebruikt. De *wet mounts* worden opgedeeld in *whole mounts* en *scale castings* (Adya et al., 2011; Chattha et al., 2011).

*Whole mounts* zijn methoden waarbij de interne structuren van een haar worden gevisualiseerd (Chattha et al., 2011). Het verschil tussen de methoden ligt vooral in het medium dat wordt gebruikt om het haar op het draagglasje te fixeren.

*Scale castings* zijn een manier om de cuticulaschubben van een haar te bestuderen door een negatieve afdruk of *scale cast* te maken. Lichtmicroscopisch onderzoek gebeurt door een haar op een draagglasje met kleverig substraat te leggen en zodra het droog is, het haar weer te verwijderen (Chattha et al., 2011).

Binnen de *wet mounts* zijn tijdelijke en permanente *mounts* van elkaar te onderscheiden. Bij tijdelijke *mounts* worden niet-destructieve stoffen gebruikt, waardoor het haar na het onderzoek onbeschadigd en gemakkelijk te verwijderen is. Bij permanente *mounts*, waarbij het haar stevig op het draagglasje

gefixeerd wordt, moet een extra handeling worden uitgevoerd indien verder onderzoek van een haar nodig is. Bij *whole mounts* wordt het dekglasje van het preparaat gebroken om het haar te verwijderen en in het geval van een *scale cast* wordt het haar uit het substraat verwijderd met een pincet.

## MATERIAAL EN METHODE

Over een periode van drie maanden werden er in de autopsiezaal van het Laboratorium Veterinaire Pathologie van de Faculteit Diergeneeskunde (UGent) haren geïncubeerd van verschillende diersoorten, i.e. hond, kat, paard, ezels, rund, varken, alpaca, schape, geit, konijn, ree, maki en zeehond. De haarcollectie vond in alle gevallen plaats ter hoogte van de rugstreek. Met behulp van een pincet werden meerdere dekhaaren (in de rugstreek waren dit wolhaaren in het geval van schapen en alpaca's) uitgetrokken (De Marinis en Asprea, 2006; Cornally en Lawton, 2018; Senthilkumar et al., 2018). De haren werden zo dicht mogelijk bij de huid vastgenomen en met een kordate beweging uitgetrokken, zonder de haren te beschadigen. De haren werden in een papieren envelop gestopt, waarop het identificatienummer, de vachtkleur, het ras, het geslacht en de leeftijd werden genoteerd. De bewaring van de enveloppen gebeurde vervolgens in een afsluitbare plastic ton. In de ton werd een zakje silicakorrels toegevoegd om eventueel ingetreden vocht uit de omgeving te absorberen (Kendall en McKelvey, 2008).

Er werden tien methoden geëvalueerd voor het maken van *whole mounts* en twee voor het maken van een haarafdruk (Tabel 1). Bij de *whole mount*-methoden werd methode 1 uitgevoerd door een haar

zonder media aan te brengen op een dekglasjes en vervolgens vast te zetten aan de uiteinden met plakband. Bij methode 2 werd er een haar aangebracht op een dekglasje en vervolgens bedekt met doorzichtig plakband. Bij methode 4w werd er een haar aangebracht op een dekglasje en met transparante nagellak een laag over het haar aangebracht. Methode 3, 6, 7, 8, 9, 10 en 11 werden uitgevoerd door een druppel van het desbetreffende medium aan te brengen op een draagglasje alvorens er een haar op aan te brengen en er bovenop een dekglasje te plaatsen. Het medium van methode 7 werd hiervoor geprepareerd volgens het recept van Larry Legg: [www.microscopy-uk.org.uk](http://www.microscopy-uk.org.uk)

Voor de *casting*-methoden werd er voor methode 4c een verticale strook nagellak aangebracht op het draagglasje met behulp van een nagellakwastje en bij methode 5 werd de gelatineoplossing aangebracht op het draagglasje met een kleine lepel in zoverre dat er een vlakke gelatinelaag ontstond. Na enkele seconden werd bij beide methoden het haar bovenop het nog plakkerige medium aangebracht. In het geval van M4c kon het haar met een pincet uit de nagellak worden verwijderd binnen een tijdsbestek van twee à vijftien minuten. Bij methode 5 dient er een minimum van dertig minuten te worden gewacht, alvorens het haar met een pincet terug uit het medium te verwijderen.

Bovengenoemde methoden werden een voor een op de haren van twee zoogdieren uitgetest: één dier met een witte en één met een donkerbruine vachtkleur. Na toepassing van elke methode werden de haren op de geprepareerde dekglasjes onder een lichtmicroscoop (Leica DMLB 100S) bekeken, gefotografeerd en gefilmd met een mobiele telefoon (Xiaomi Redmi 9 Pro) op een 100x- en een 400x-vergroting. Het

**Tabel 1. De *mounting media* die zijn geëvalueerd met betrekking tot het maken van *whole mounts* en haarafdrukken. (Twiggs, 1975; Teerink et al., 1991; Crocker, 1998; Adya et al., 2011; Sepulveda en Kinsella, 2013; Cornally en Lawton, 2016; Ahmed et al., 2018).**

Methoden <i>whole mount</i>	<i>Mounting media</i>
Methode 1 (M1)	<i>Dry mount</i>
Methode 2 (M2)	Plakband
Methode 3 (M3)	Water
Methode 4w (M4w)	Transparante nagellak (Essence)
Methode 6 (M6)	Paraffineolie
Methode 7 (M7)	Fructoseoplossing (Larry Legg)
Methode 8 (M8)	Maissiroop (Karo)
Methode 9 (M9)	Aquatex (Merck) hematologisch <i>mounting medium</i>
Methode 10 (M10)	Lactofenol
Methode 11 (M11)	Richard Allen Scientific <i>mounting medium</i> (RASMM)
Methoden haarafdrukken	<i>Mounting media</i>
Methode 4c (M4c)	Transparante nagellak (Essence)
Methode 5 (M5)	Gelatineoplossing 20%

**Tabel 2. Beoordelingsresultaten van twaalf geteste methoden. Aan ieder criterium werd per methode één van de volgende scores toegekend: - (slecht), +/- (matig), + (goed).**

M	Beeld- kwaliteit medulla	Beeld- kwaliteit cuticula	Hanteer- baarheid	Benodigde tijd	Reprodu- ceerbaarheid	Bewaar- tijd	Aankoop- prijs
<b>Cast</b>							
<b>M4c</b>		+	+	+/-	+	+	+(3€)
<b>M5</b>		+/-	-	-	+/-	-	+(5€)
<b>Whole mount</b>							
<b>M1</b>	-		+	+	+	+	+(<1€)
<b>M2</b>	+/-		+/-	+	+	+	+(<1€)
<b>M3</b>	+/-		+	+	+	-	+(<1€)
<b>M4w</b>	+/-		+	+/-	+	+	+(3€)
<b>M6</b>	+/-		-	+	+	-	+(4€)
<b>M7</b>	+		-	-	+/-	-	+(3€)
<b>M8</b>	+/-		-	+	+	-	+(7€)
<b>M9</b>	+		+	+	+	+	+/- (43€)
<b>M10</b>	-		+/-	+	+	-	+(10€)
<b>M11</b>	+/-		-	+	+	+	-(165€)

M= methode, M4c= transparante nagellak (Essence), M5= gelatine, M1= *dry mount*, M2= plakband, M3= water, M4w= transparante nagellak (Essence), M6= paraffineolie, M7= fructoseoplossing, M8= maissiroop (Karo), M9= Aquatex (Merck), M10= lactofenol, M11= RASMM (Thermo Scientific). Donker-groene arcering = criterium niet van toepassing op de desbetreffende methode.

proces van prepareren, fotograferen en filmen werd herhaald, totdat alle twaalf methoden toegepast waren voor beide dieren.

De foto's van de haren werden op een computerscherm (MacBook Pro) beoordeeld op volgende criteria: kwaliteit van visualisatie van de medulla en de cuticulaschubben. Daarnaast werden de hanteerbaarheid, de benodigde tijd voor het uitvoeren van het onderzoek, de reproduceerbaarheid, de mogelijkheid tot bewaring en de aankoopprijs van het *mounting medium* beoordeeld (Tabel 2). Aan bovengenoemde criteria werd per methode een van de volgende scores toegekend: - (slecht), +/- (matig), + (goed). Bij 'benodigde tijd' werd een preparatietijd van boven de dertig minuten beschouwd als slecht, een tijd onder de vijf minuten als goed en een tijd tussen de vijf en dertig minuten als matig. De bewaring werd beoordeeld op basis van de mogelijkheid om de draagglazjes met de geprepareerde haren verticaal te bewaren in een microscopie-preparatenbox.

Op basis van de resultaten werd verder gewerkt met twee methoden. Van deze twee methoden werden tijdens het verdere verloop van de studie per dier foto's genomen met een fototoestel (Leica DFC 320 R2) dat gemonteerd werd op een microscoop (Leica DM LB 2). De haarkleur, de haarlengte, de haardiameter, de medulladiameter, het medullaire patroon, de medullaire structuur, de medullaire rand, het schubbenpatroon van de cuticula, de rand van de schubben en de afstand tussen de schubben werden onderzocht met behulp van een microscoop (Leica DM LB 2) en vervolgens genoteerd per individueel dier. De medulla- en haardiameter werd gemeten op de helft van de totale haarlengte met behulp van een beeldanalyse-systeem (Leica Application Suite 4.0), waarna de medullaire index berekend werd met Excel. De typering

van de medulla en het schubbenpatroon van de cuticula gebeurde op basis van foto's met 100x- en 200x-vergroting met behulp van de gegevens vermeld in Figuur 1 en 2. Naderhand werd er met alle verzamelde gegevens nagegaan in hoeverre er karakteristieken of unieke kenmerken aanwezig waren in de cuticula en medulla, die specifiek toe te schrijven waren aan een bepaalde diersoort.

## RESULTATEN

Op basis van de testresultaten werden concreet uitgewerkte protocollen opgesteld voor één *casting*-methode (M4c) en één *whole mount*-methode (M9) (Tabel 2). Deze protocollen leggen stap voor stap uit hoe een haar geïdentificeerd, geëtiketteerd, bewaard en vervolgens onderzocht dient te worden en welke materialen en producten daarbij nodig zijn. Beide protocollen beginnen met de eerder besproken richtlijnen voor haarcollectie en identificatie.

### Protocol nagellak-casting-methode voor de visualisatie van het schubpatroon (M4c)

Er wordt op de korte zijde van een draagglazje een verticale strook transparante nagellak aangebracht. Na drie seconden wordt het haar met een pincet op de nagellak gelegd en eventueel aangedrukt om zeker te zijn dat de haarschacht in de nagellak terechtkomt. De nagellak moet vervolgens enkele minuten drogen vooraleer het haar met behulp van een pincet verwijderd wordt uit de nagellak. Als de haarlengte beperkt is, kan met een naald eerst één kant van het haar uit de nagellak worden losgemaakt, vooraleer de rest met het pincet verwijderd wordt. De resulterende afdruk

wordt bekeken en gefotografeerd op een 100x- en 200x-vergroting (Leica DM LB 2, Leica DFC 320 R2, Las 4.0). De typering van de cuticulaschubben kan gebeuren middels een vergelijking van de gemaakte foto's met de patronen weergegeven in Figuur 2.

### Protocol *whole mount* met Aquatex voor de visualisatie van de inwendige structuren (M9)

Een druppel Aquatex (Merck, Duitsland) ter grootte van ongeveer 0,5 cm wordt aangebracht op een draagglaasje. Vervolgens wordt één haar gepositioneerd op het draagglaasje in de druppel. Indien het haar te lang is voor het draagglaasje, wordt het haar in twee stukken geknipt zodat zowel de wortel als de haarpunt ingebed kunnen worden. Een dekglasje wordt manueel op het preparaat geplaatst, terwijl het haar met een pincet wordt gefixeerd, zodat deze niet uit beeld verdwijnt door de verplaatsing van de druppel Aquatex onder het dekglasje. De *whole mount* die is ontstaan wordt na 24 uur bekeken en gefotografeerd op een 100x- en 200x-vergroting (Leica DM LB 2, Las 4.0). De typering van de medullaire kenmerken kan gebeuren middels een vergelijking van de gemaakte foto's met de patronen weergegeven in Figuur 1.

### Fotoatlas

De foto's worden samengevoegd in een fotoatlas, nadat deze zijn bijgesneden en eventueel vergroot om de morfologische kenmerken het beste te kunnen weergeven. Er werden in totaal 304 foto's gemaakt van 152 individuele dieren van dertien diersoorten (152 foto's van haarafdrukken, 152 foto's van *whole mounts*).

### Morfologische bevindingen

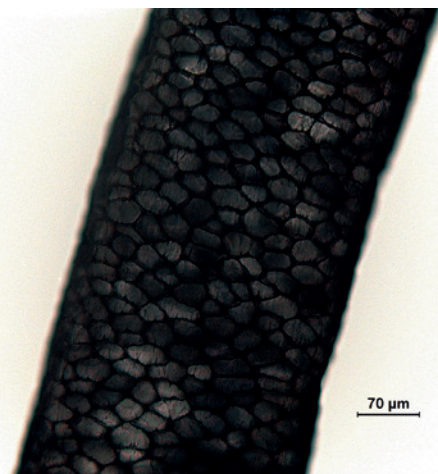
De meest relevante bevindingen met betrekking tot het vergelijken en identificeren van haren waren als volgt. Bij bijna alle dieren was de medulla continu, indien deze zichtbaar was. Bij schapen was er slechts in één geval een medulla aanwezig; deze was gefragmenteerd. Bij alle katten waren de medullaranden geschubd. Volwassen reeën met een wintervacht onderscheidden zich in dit onderzoek gemakkelijk van de andere diersoorten; dit op basis van zowel de structuur van de medulla, als op basis van de haardiameter. Het was de enige diersoort in dit onderzoek waarbij de medulla een *filled lattice*-structuur vertoonde (Figuur 3). Net als bij het varken waren de reeënharen dikker dan 100 microns. Konijnen onderscheidden zich volgens deze resultaten gemakkelijk van de rest van de andere diersoorten, wat toe te schrijven was aan zowel de structuur van de medulla, als het schubbenpatroon van de cuticula (Figuur 4). De haren van konijnen vertoonden een multiseriate medulla, waarbij meerdere rijen binnen de medulla zichtbaar waren. De schubben van de cuticula vertoonden ter hoogte

van de schede een dubbel vissengraatpatroon. De cuticulaschubben van de wolharen van schapen hadden een typerend uitzicht, wat in de terminologie wordt omschreven als een regelmatig mozaïek (Figuur 5).

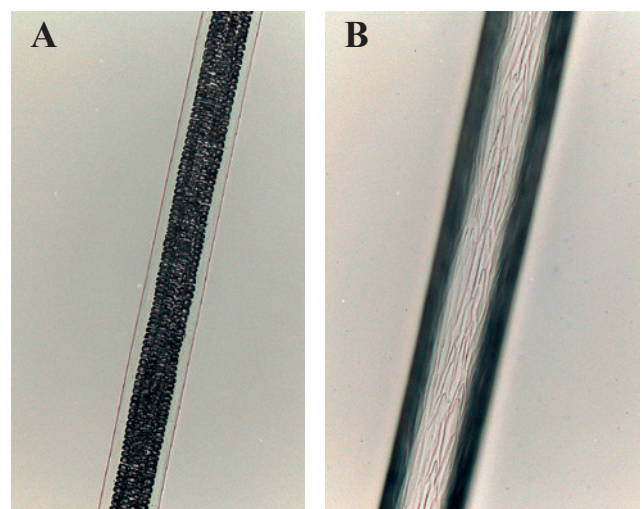
Diersoortidentificatie bleek voor de andere diersoorten i.e. hond, kat, paard, ezel, rund, varken, alpaca, geit, maki en zeehond, op basis van enkel het microscopisch uitzicht van de cortex en cuticula niet mogelijk.

### DISCUSSIE

Er dient vermeld te worden dat in deze studie enkel gefocust werd op haaridentificatie met behulp van lichtmicroscopie. Er werd geen gebruik gemaakt van een fluorescentie- of scanning-elektronenmicroscop, aangezien deze vaak zeer duur zijn in aankoop en er naar een betaalbare methode gestreefd werd. Desondanks bestaan er tegenwoordig methoden waarbij er wel met deze microscopen gewerkt wordt. Het is dus



Figuur 3. Medulla van een reeënhair met een *filled lattice*-structuur op een 100 x-vergroting (Leica).



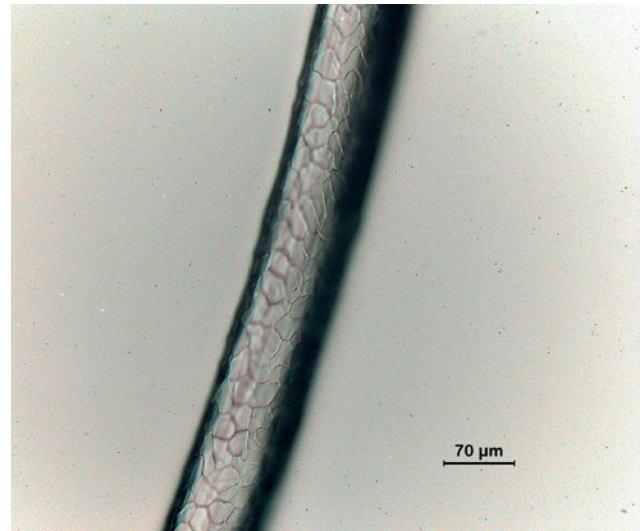
Figuur 4. Medulla en cuticula van een konijnenhaar. A. Een multiseriate medulla en B. een dubbele visgratecuticula schubpatroon op een 200 x-vergroting (Leica).

mogelijk dat de beelden bekomen in deze studie van mindere kwaliteit zijn dan beelden verkregen met recentere methoden.

In de voorliggende studie werden telkens haren uit de rugstreek gebruikt voor de morfologische haaridentificatie. Voor de meeste dieren waren de haren uit deze regio dekharen. Dekharen van andere lichaamsregio's zouden echter ook gebruikt kunnen worden. Deze vertonen immers vergelijkbare kenmerken met betrekking tot de medulla en cuticulaschubben (De Marinis en Asprea, 2006). Deze kenmerken zijn hier echter vaak minder uitgesproken en daardoor minder geschikt voor identificatie. In het geval van schapen en alpaca's werden niet de dekharen, maar wel de wolharen in beschouwing genomen vanwege de plaats van haarcollectie op het lichaam van het dier. Omdat wolharen minder informatie dragen voor identificatie en in deze studie slechts beperkt verzameld werden (tien dieren), waren de vastgestelde karakteristieken mogelijk niet diersoortspecifiek. Voor een correctere vergelijking zouden er van deze dieren bijkomende dekharen moeten worden genomen (eventueel van andere regio's op het lichaam).

De haarcollectie gebeurde door middel van het uittrekken van de haren met een pincet. Haarcollectie kan ook op andere manieren gebeuren, waarbij de haren worden uitgewreven, uitgekamd, afgeknipt of verzameld worden uit de leefruimte van een dier (Oien, 2009). Het voordeel van uittrekken is dat de volledige lengte van het haar kan worden gemeten en, dat indien gewenst, de wortel ook nog verder kan worden onderzocht. De focus in deze studie werd vooral gelegd op het scenario waar de haarwortel niet aanwezig was, waardoor de haarwortel niet verder bestudeerd kon worden. Aangezien telogene haarwortels diersoortverschillen kunnen vertonen, zou de inclusie van haarwortels in toekomstige studies een extra criterium kunnen geven voor haaridentificatie. In dat geval zouden er bijkomende haren moeten worden uitgewreven, om zo deze telogene wortels te bekomen. Na de haarcollectie werden de verschillende *mounting*-methoden op de haren van dezelfde dieren getest, zodat verschillen in beeldkwaliteit enkel konden worden toegeschreven aan de methode en niet aan de haren zelf. Er werd besloten de haren te testen van één dier met een witte vacht en één dier met een donkerbruine vacht, om zo het beste te kunnen inschatten welke methoden er over het algemeen een goed beeld gaven. Er bestaan nog andere haar-*mounting media*, waarvan er een ruim aantal xyleen bevat (Roe et al., 1991). In deze studie werd gestreefd naar een voor iedereen haalbare methode en daarom werd de focus gelegd op kwalitatief goede, toegankelijke en betaalbare methoden.

In de entomologie wordt evenzeer gebruik gemaakt van *mounting*-methoden voor het prepareren van parasieten en insecten. Soms worden onder andere fructose-oplossing, maissiroop en lactofenol gebruikt (www.microscopy-uk.org.uk). Bij het maken



**Figuur 5.** Regelmatig mozaïek-schubpatroon van de cuticula van een wolhaar van een schaap op een 200 x-vergroting (Leica).

van preparaten voor histologisch of cytologisch onderzoek worden er ook *mounting media* gebruikt. In dit onderzoek werden hiervan de transparante producten Aquatex (Merck, Duitsland) en RASMM (Thermo Scientific, USA) ingesloten.

De methoden die in de voorliggende studie getest werden, weken in een aantal gevallen af van wat in de literatuur beschreven wordt. Ten eerste wordt in meerdere studies aangegeven dat het microscopisch haaronderzoek op een 100x- en een 400x-vergroting dient te gebeuren (Teerink, 1991; Oien, 2009). Aangezien een 400x-vergroting in de huidige studie een minder goed overzicht van de haren in hun geheel gaf, werd er besloten om 200x als grootste vergroting aan te houden. Ten tweede week de droogtijd bij de nagellak *casting*-methode af van de droogtijd die in de literatuur (vijftien minuten) wordt beschreven. De gebruikte nagellak (Essence, Duitsland) in deze studie was sneldrogend en na het testen met vijf verschillende droogtijden (twee, vijf, acht, tien en vijftien minuten) werd in het protocol daardoor een kortere droogtijd van 4 à 5 minuten aangehouden.

Voor de *whole mounts* werden, met uitzondering van paraffineolie, geen *mounting media* getest op oliebasis; desondanks hadden deze media mogelijk een betere penetratie kunnen geven en zo ook een duidelijker beeld van de medulla ten opzichte van het *mounting media* op waterbasis (Aquatex, Merck, Duitsland).

De bewaarbaarheid werd slechts getest met één soort preparatenbox. Het gebruik van andere boxen of mappen had er wellicht toe geleid dat de bewaarbaarheid telkens anders gescoord zou zijn geweest.

In deze studie werden voor de diersoortidentificatie niet alle onderdelen van het haar onderzocht. Ten eerste werd er slechts beperkt macroscopisch onderzoek verricht naar de haren, i. e. haarkleur en haar-

lengte.

Ten tweede werd de cuticula slechts op één locatie van het haar gefotografeerd en onderzocht, niet over de gehele lengte van het haar (schede versus schild). Ten derde werden er geen dwarsdoorsnedes gemaakt, waardoor geen bijkomende informatie over de haarvorm verkregen werd.

Het berekenen van de medullaire index gebeurde in Excel. Doordat er in de studie geen gebruik werd gemaakt van een statistiekprogramma met bijkomende standaarddeviatie, zijn er geen statistisch relevante resultaten beschikbaar.

Daarnaast zijn er nog enkele bemerkingen met betrekking tot de fotoatlas en de bekomen resultaten. Om smallere haren in de fotoatlas vlotter te kunnen typeren en vergelijken, werden de foto's van deze haren vergroot en bijgesneden. Dit had ook verholpen kunnen worden als een bijkomende foto van deze specifieke haren zou zijn genomen op een 400x-vergroting.

Tot slot kon er vooraf niet worden bepaald welke diersoorten en rassen aan de studie zouden deelnemen, aangezien de haarcollectie afhankelijk was van de in de autopsiezaal binnengebrachte dieren. Door de grote variatie in honden-, katten- en paardenrassen en mogelijk ook door het beperkte aantal dieren per diersoort, i. e. ezel, rund, varken, alpaca, geit, maki en zeehond was het benoemen van specifieke kenmerken voor een bepaalde diersoort niet evident, omdat andere niet-onderzochte diersoorten mogelijk dezelfde haarkenmerken konden hebben.

## CONCLUSIE

Er werden twee preparatiemethoden op punt gesteld voor zowel het maken van een negatieve afdruk (met transparante nagellak), als voor het maken van een volledige inbedding van een haar (Aquatex, Merck, Duitsland). Voor beide methoden werd een protocol opgesteld. Op basis van de structuur van de medulla en/of de schubben van de cuticula konden volgens de resultaten uit dit onderzoek konijnen, schapen en reeën vlot van de andere onderzochte diersoorten worden onderscheiden. Er is echter bijkomend onderzoek nodig naar de gehele oppervlakte van het haar, inclusief de haarwortel, vooraleer er bijkomende en/of definitieve uitspraken gedaan kunnen worden voor de zojuist genoemde en andere diersoorten op basis van de haarmorfologie.

Ten slotte werd een fotoatlas succesvol opgestart. Deze atlas kan in de toekomst, mits aangevuld door bijkomend onderzoek, gebruikt worden als naslagwerk voor microscopische haaridentificatie.

## REFERENTIES

Adya, K.A., Inamadar, A.C., Palit, A., Shivanna, R., Deshmukh, N.S., (2011). Light microscopy of the hair: A simple tool to “untangle” hair disorders. *International*

- Journal of Trichology* 3, 46.
- Ahmed, Y.A., Ali, S., Ghallab, A., (2018). Hair histology as a tool for forensic identification of some domestic animal species. *EXCLI Journal* 17, 663-670.
- Bourguignon, L., Hoste, B., Boonen, T., Vits, K., Hubrecht, F., (2008). A fluorescent microscopy-screening test for efficient STR-typing of telogen hair roots. *Forensic Science International: Genetics* 3, 27-31.
- Brandhagen, M.D., Loreille, O., Irwin, J.A., (2018). Fragmented nuclear DNA is the predominant genetic material in human hair shafts. *Genes* 9, 640.
- Brunner, H., Coman, B.J., (1974). *The Identification of Mammalian Hair*. Inkata Press, Melbourne, Australia, p. 176.
- Chattha, S.A., Anjum, K.M., Altaf, M., Yousaf, M.Z., (2011). Hair mounting technique: helpful in conservation of carnivores. *FUUAST Journal of Biology* 1(2), 53-59.
- Cornally, A., Lawton, C., (2016). A guide to the identification of Irish mammal hair. *Irish Wildlife Manuals* 92, 40.
- Crocker, E.J., (1998). A new technique for the rapid simultaneous examination of medullae and cuticular patterns of hairs. *Microscope* 46, 169-173.
- De Marinis, A.M., Asprea, A., (2006). Hair identification key of wild and domestic ungulates from southern Europe. *Wildlife Biology* 12, 305-320.
- Deedrick, D.W., Koch, S.L., (2004). Microscopy of hair. A practical guide and manual for human hairs. *Forensic Science Communications* 6, 1-45.
- Deedrick, D.W., Koch, S.L., (2004). Microscopy of hair. A practical guide and manual for animal hairs. *Forensic Science Communications*, 1-32.
- Hicks, J.W., (1977). Basic structure of hair. In: *Microscopy of Hair: A Practical Guide and Manual*. Federal Bureau of Investigation, Washington, USA, p. 1-6.
- Kendall, K.C., McKelvey, K.S., (2008). Hair collection. In: Long R. A., MacKay P., Ray J., C., Zielinski W. J. (editors). *Noninvasive Survey Methods for North American Carnivores*. Island Press, Washington, DC, USA, p. 135-176.
- Kolowski, J.C., Petraco, N., Wallace, M.M., De Forest, P.R., Prinz, M., (2004). A comparison study of hair examination methodologies. *Journal of Forensic Science* 49, 1253-1255
- Lynch, M., (2003). God's signature: DNA profiling, the new gold standard in forensic science. *Endeavour* 27, 93-97.
- Mathiak, H.A., (1938). A key to hairs of the mammals of Southern Michigan. *The Journal of Wildlife Management* 2, 251.
- Melton, T., Dimick, G., Higgins, B., Yon, M., Holland, C., (2012). Mitochondrial DNA analysis of 114 hairs measuring less than 1 cm from a 19-year-old homicide. *The Journal of Wildlife Management* 3, 12.
- Oien, C.T., (2009). Forensic hair comparison: background information for interpretation. *Forensic Science Communications* 11, 1-25.
- Pilli, E., Casamassima, R., Vai, S., Virgili, A., Barni, F., D'errico, G., Berti, A., Lago, G., Caramelli, D., (2014). Pet fur or fake fur? A forensic approach. *Investigative Genetics* 5, 7.
- Robertson, J., (1999). Forensic examination of human hair. In: Robertson J. (editor). *Taylor & Francis Forensic Science Series*. London, Engeland, p. 80-143.
- Roe, G.M., Cook, R., North, C., (1991). An evaluation of mountants for use in forensic hair examination. *Journal*



- of the Forensic Science Society 31*, 59-65.
- Sari, A., Arpacik, A., (2018). Morphological hair identification key of common mammals in Turkey. *Applied Ecology and Environmental Research 16*, 4593-4603.
- Senthilkumar, S., Gnanadevi, R., Kannan, T.A., Arunaman, C.S., (2018). Microanatomical observations of hair in domestic animals: A comparative study. *Journal of Entomology and Zoology Studies 6*, 1925-1929.
- Sepulveda, M.S., Kinsella, J.M., (2013). Helminth collection and identification from wildlife. *Journal of Visualized Experiments 82*. DOI: 10.3791/51000
- Syndercombe-Court, D., (2021). Mitochondrial DNA in forensic use. *Emerging Topics in Life Sciences 5(3)*, 415-426.
- Teerink, B.J., (1991). How to identify hairs. In: *Hair of West European Mammals: Atlas and Identification Key*. Cambridge University Press, Cambridge, Engeland, p. 5-18.
- Twigg, G.I., (1975). Finding mammals—their signs and remains. *Mammal Review 5*, 71-82.
- Wandhare, P.P., S., B.M., (2017). Trichology: A science of hair examination in identification of dog breeds. *International Journal of Applied and Pure Science and Agriculture 3*, 61-66.
- Wilson, L.J., Wheeler, B.P., (2008). Hair examinations. In: *Practical Forensic Microscopy: A Laboratory Manual*. Wiley, Chichester, England, p. 149-191.



© 2024 by the authors. Licensee Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift, Ghent University, Belgium. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



# MEDVET

**Bij het laboratorium  
MEDVET kan u rekenen op  
een kwaliteitsvolle service waar u en  
uw patiënt centraal staan. Het team van  
dierenartsen zal u met hun expertise bijstaan  
bij elke stap van uw diagnostische onderzoek.**

