
SYNTAR

Synthese-onderzoek op
archeologisch materiaal
uit Vlaanderen.

Agentschap
Onroerend
Erfgoed



SYNTAR 37

Synthese-onderzoek op
archeologisch materiaal
uit Vlaanderen.

Besiect ende besmet

De pathogene synthese van een leprozerie tegenover andere
middeleeuwse begraafplaatsen in Vlaanderen

Larmuseau M.H.D., Gaens N. & Kivisild T.

(m.m.v. Beneker O., Pauwels K., Guellil M., Inskip S., Blom A., De Winter N., Geypen J.,
Hellebuyck A., Pecnik J., Schünemann V.)

COLOFON

TITEL

Besiekt ende besmet

De pathogene synthese van een leproserie tegenover andere middeleeuwse
begraafplaatsen in Vlaanderen

REEKS

SYNTAR nr. 37

AUTEURS

Larmuseau M.H.D., Gaens N. & Kivisild T.

(m.m.v. Beneker O., Pauwels K., Guellil M., Inskip S., Blom A., De Winter N., Geypen J.,
Hellebuyck A., Pecnik J., Schünemann V.)

JAAR VAN UITGAVE

2026

Een uitgave van agentschap Onroerend Erfgoed

Wetenschappelijke instelling van de Vlaamse Overheid, Beleidsdomein Omgeving

Published by the Flanders Heritage Agency

Scientific Institution of the Flemish Government, policy area Environment

VERANTWOORDELIJKE UITGEVER

Peter De Wilde

OMSLAGILLUSTRATIE

Skeletten van het leproseriekerkhof van Hooge Siecken waarvan tanden werden
bemonsterd voor *targeted sequencing* op lepra-DNA.

Copyright agentschap Onroerend Erfgoed, foto: Sofie Vanhoutte

agentschap Onroerend Erfgoed

Koning Albert II-laan 15 bus 236

1210 Brussel

T +32 2 553 16 50

info@onroenderfgoed.be

www.onroenderfgoed.be

Dit werk is beschikbaar onder de Modellicentie Gratis Hergebruik v1.0.

This work is licensed under the Free Open Data Licence v1.0.

Dit werk is beschikbaar onder een Creative Commons Naamsvermelding 4.0

Internationaal-licentie. Bezoek <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> om een
kopie te zien van de licentie.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

<https://doi.org/10.55465/MIER2925>

ISSN 2736-6057

ISBN 978-90-752-3094-9

D/2026/3241/359

Rapport syntheseproject archeologie

Besiect ende Besmet – De pathogene synthese van een leprozerie & andere middeleeuwse begraafplaatsen in Vlaanderen

Larmuseau Maarten H.D., Gaens Noah, Kivisild Toomas

Met medewerking van: Beneker Owyn, Pauwels Kaat, Guellil Meriam, Inskip Sarah, Blom Alette, De Winter Natasja, Geypen Jan, Hellebuyck Anke, Pecnik Jaruschka, Schünemann Verena

- Abstract
- Onze uitgangssituatie
- Site 1 Koksijde
 - Achtergrond
 - Afkomst & Verwantschap
 - Pathogenen
 - a) Methode
 - b) Algemene resultaten
- Site 2 Sint-Truiden
 - Achtergrond
 - Afkomst & Verwantschap
 - Pathogenen
 - a) Methode
 - b) Algemene resultaten
 - c) *Yersinia pestis*
 - d) *Borrelia recurrentis*
 - e) *Leptospira interrogans*
 - f) Betaherpesvirus 6A en 6B
- Sites 3 & 4 Hooge Siecken & Sint-Niklaasparochie leper
 - Achtergrond Hooge Siecken
 - Achtergrond Sint-Niklaasparochie
 - Methode genetische analyse leperse stalen
 - Resultaten genetische analyse leperse stalen
 - Interpretatie genetische analyse

- Pathogenen
 - a) Fysisch antropologisch onderzoek
 - b) *Mycobacterium leprae*
- Outreach
 - Wetenschappelijke publicaties
 - Nieuwsberichten Sint-Truiden
 - Tentoonstelling (W)onderland
 - Familiegeschiedenis
- Conclusie
- Referenties
- Protocol

Abstract

Toen het syntheseproject *Besiekt ende Besmet* in 2022 van start ging, waren pathogenen, besmettingen en quarantainemaatregelen nog dagelijkse realiteit in de nasleep van de COVID-19-pandemie. Intussen is die crisis (voorlopig) voorbij, maar de dreiging van een volgende pandemie blijft reëel. Ook onze voorouders werden geconfronteerd met besmettelijke ziekten en epidemieën. Archeologisch onderzoek naar oudDNA van ziekteverwekkers op menselijk skeletmateriaal maakt deze realiteit zichtbaar en levert fundamentele inzichten op over de oorsprong, verspreiding en impact van infectieziekten. Tegelijk laat archeologie toe om te reconstrueren hoe onze voorouders zich probeerden te beschermen tegen ziektekiemen, bijvoorbeeld via afzondering in leprozerieën of het aanleggen van aparte begraafplaatsen voor pestslachtoffers.

In het Vlaamse archeologische landschap bleven dergelijke studies tot nog toe zeldzaam. Dit syntheseproject bracht daar verandering in. We onderzochten vier middeleeuwse sites in het huidige Vlaanderen, waarbij telkens zowel de aanwezigheid van pathogenen als de afkomst en verwantschap van de begraven individuen in kaart werden gebracht.

1. **Koksijde** (laat-Merovingisch, 675–750 na Chr.): het oudDNA van 50 skeletten toonde een verrassend brede genetische diversiteit en de aanwezigheid van onder meer hepatitis B.

2. **Sint-Truiden** (8e–18e eeuw): met meer dan 400 onderzochte skeletten gaat het wereldwijd om de grootste oudDNA-studie ooit uitgevoerd op één

archeologische site. Hier werden voor het eerst directe genetische sporen van de pest in onze contreien in de 14^{de}-eeuw aangetoond, zonder enige vermelding in de lokale geschreven bronnen.

3. **Hooge Siecken** (Sint-Jan, leper, 13^{de}-14^{de} eeuw): deze leprozerie leverde duidelijke genetische sporen van lepra op. Verwantschapsanalyses toonden bovendien aan dat de meeste bewoners een lokale herkomst hadden, met zelfs verre verwanten op het stedelijke parochiekerkhof van Sint-Niklaas.

4. **Sint-Niklaasparochie** (leper, 1200-1600): deze parochiale begraafplaats leverde een belangrijk vergelijkingspunt op met de leprozerie Hooge Siecken. Op basis van oudDNA werd zowel afkomst als verwantschap onderzocht, wat leidde tot nieuwe inzichten in de sociale en biologische structuren van de middeleeuwse stedelijke bevolking.

De resultaten zijn ronduit opmerkelijk. Voor het eerst werden directe genetische sporen van zowel lepra als pest aangetoond in middeleeuws Vlaanderen – waarbij we de regio bedoelen die we vandaag als ‘Vlaanderen’ beschouwen. De vondst van pest-DNA in Sint-Truiden in de 14^{de} eeuw, zonder enige schriftelijke vermelding, onderstreept het belang van genetisch onderzoek voor het ontsluiten van verborgen hoofdstukken uit onze geschiedenis. Bovendien blijkt dat deze personen niet in massagraven maar verspreid op het parochiekerkhof begraven werden. Even verrassend was de genetische verwantschap tussen individuen uit de leprozerie en die uit de stad leper zelf, wat wijst op een lokaal geïnstitutionaliseerd zorgsysteem.

Deze synthese toont het potentieel aan van oudDNA-onderzoek naar pathogenen en de historische omgang met infectieziekten. Het project biedt een innovatief perspectief op het verleden en opent nieuwe onderzoeksvelden binnen de Vlaamse archeologie. De resultaten wekten reeds brede publieke belangstelling en zullen in 2026 verder ontsloten worden via de geplande tentoonstelling *(W)onderland* in leper en het participatief project ‘Luid Geratel’, evenals via online en gedrukte publicaties.

Trefwoorden: middeleeuwen, ziektekiemen, afkomst, lepra, pest, oudDNA, verwantschap, genetisch erfgoed, publieke participatie, Vlaanderen

Onze uitgangssituatie

Pathogenen of ziektekiemen zijn ziekteverwekkers van biologische oorsprong. Hiertoe behoren virussen, bacteriën, schimmels en parasieten die infectieziekten kunnen veroorzaken bij mens en dier. Onze wetenschappelijke kennis over pathogenen is de afgelopen decennia sterk toegenomen, met een duidelijke versnelling tijdens de COVID-19-pandemie, die vanaf 2020 wereldwijd een ongeziene maatschappelijke impact had. Toch wordt reeds lang en intensief onderzoek verricht naar het ontstaan, de verspreiding en de ziektepatronen van pathogenen, niet alleen met het oog op actuele volksgezondheid, maar ook om hun historische betekenis te begrijpen.

Een essentiële doorbraak in het onderzoek naar infectieziekten uit het verleden kwam er dankzij de revolutionaire ontwikkeling van oudDNA-technieken. Via deze technieken werd het mogelijk om **DNA van pathogenen** rechtstreeks te detecteren in archeologisch skeletmateriaal. Zo konden intussen volledige genomen worden gereconstrueerd van ziekteverwekkers zoals de pestbacterie (*Yersinia pestis*), de salmonellabacterie (*Salmonella enterica*), de tuberculosebacterie (*Mycobacterium tuberculosis*), de leprabacterie (*Mycobacterium leprae*) en het hepatitis B-virus (HBV), uit prehistorische en historische contexten (Spyrou *et al.*, 2019).

Deze technologische doorbraak leverde niet enkel nieuwe inzichten op in het historische voorkomen en de genetische variatie van pathogenen, maar gaf ook aanknopingspunten over hun invloed op toenmalige samenlevingen. Epidemieën lieten sporen na in de demografie, ruimtelijke organisatie, sociale structuren en zelfs in het collectieve geheugen. Bovendien is het onderzoek naar pandemieën uit het verleden geen louter geschiedkundig streven. De genetische evolutie van pathogenen doorheen de tijd biedt waardevolle informatie over hun aanpassingsvermogen, virulentie en interactie met de menselijke gastheer. Kennis van deze evolutionaire trajecten kan bijdragen aan de hedendaagse medische inzichten en zelfs

toekomstige uitbraken beter helpen voorspellen en beheersen. Archeologisch en genetisch onderzoek naar ziektekiemen draagt op die manier actief bij aan de volksgezondheid en vormt een unieke brug tussen verleden en toekomst.

Naast het identificeren van pathogenen via oudDNA, is ook de **archeologische context** waarin deze ziektekiemen worden aangetroffen van cruciaal belang. Net zoals het belangrijk is te weten *welk* pathogeen circuleerde, is het minstens even relevant te begrijpen *hoe* samenlevingen daarop reageerden. Dit gaat onder meer over concrete maatregelen die genomen werden om besmetting tegen te gaan of om besmette individuen te isoleren. Denk bijvoorbeeld aan leprozerieën in middeleeuws Europa waar leprapatiënten ondergebracht werden, of aan afzonderlijke begraafplaatsen die specifiek dienden voor pestslachtoffers. Deze instellingen waren vaak omgeven door sociale stigma's, juridische regels en rituele praktijken, maar vervulden tegelijk een duidelijke medische en maatschappelijke functie. Dankzij archeologisch onderzoek kunnen we dergelijke maatregelen reconstrueren en begrijpen in hun bredere sociale context.

Tot aan dit synthesesproject bood de Vlaamse archeologie nauwelijks aanknopingspunten voor dergelijk interdisciplinair onderzoek, ondanks de aanwezigheid van relevante sites zoals middeleeuwse begraafplaatsen en zelfs een historische leprozerie. Met dit synthesesproject benutten we voor het eerst het potentieel van oudDNA in combinatie met archeologische context in Vlaanderen. Vier middeleeuwse sites in het huidige Vlaanderen werden onderzocht, waarbij zowel de aanwezigheid van pathogenen als de afkomst en verwantschap van de begraven individuen in kaart werd gebracht:

1. **De laat-Merovingische begraafplaats van Koksijde** (ca. 675-750 na Chr.): hier werd het oudDNA van 50 individuen geanalyseerd op de aanwezigheid van pathogenen, en gekoppeld aan hun genetische afkomst en onderlinge verwantschap.
2. **De middeleeuwse en vroegmoderne begraafplaats op de Groenmarkt van Sint-Truiden** (650-1800 na Chr.): met meer dan 400 onderzochte individuen is dit de grootste oudDNA-studie ooit op één archeologische site wereldwijd. Het oudDNA van de aanwezige

pathogenen werd geanalyseerd en gekoppeld aan de genetische afkomst en onderlinge verwantschap van de begraven personen.

3. **De leprozerie ‘Hooge Siecken’ in Sint-Jan, leper (13^{de}-14^{de} eeuw):** hier werd oudDNA-onderzoek verricht op de begraven individuen om zowel afkomst en verwantschap als de aanwezigheid van lepra te detecteren. De resultaten werden aangevuld met fysisch-anthropologisch onderzoek naar ziektesporen in het skelet.
4. **Het kerkhof van de Sint-Niklaasparochie in leper (1200-1600):** deze site fungeerde als referentiepunt voor vergelijking met de leprozerie. Het onderzoek richtte zich op afkomst, verwantschap en mogelijke familiale linkjes tussen beide begraafplaatsen.

Door menselijk botweefsel uit deze vier sites via oudDNA te analyseren, ontwikkelden we een vernieuwend interdisciplinair onderzoeksmodel dat inzichten oplevert over zowel de ziektekiemen zelf als de manier waarop middeleeuwse gemeenschappen daarmee omgingen. In wat volgt bespreken we de resultaten van elk van deze sites afzonderlijk, om vervolgens de belangrijkste bevindingen, bredere conclusies en maatschappelijke implicaties samen te brengen in een overkoepelende synthese.

Site 1: Laat-Merovingisch Koksijde (ca. 675-750 na Chr.)



I. Achtergrond

De laat-Merovingische site van Koksijde kwam bij toeval aan het licht in 2016, toen een graafmachine botmateriaal aantroef tijdens de aanleg van een nieuw politiekantoor. De daaropvolgende archeologische opgraving in de badstad bracht een uitzonderlijk rijke vroegmiddeleeuwse context aan het licht: een nederzetting met sporen van bewoning en een grafveld. Geen enkele andere vroegmiddeleeuwse vindplaats aan de Vlaamse kust omvat zo'n breed spectrum van archeologische vondsten: bewoningsstructuren, grafcontexten, botmateriaal, culturele artefacten en ecologische sporen. Zulke contexten zijn zeldzaam in Vlaanderen en bieden unieke inzichten in de levenswijze, sterfte, mobiliteit en sociale organisatie in de eerste eeuwen na de val van het West-Romeinse Rijk (Dewilde *et al.*, 2019).



Illustratie 1 De laat-Merovingische site met bewoning en grafveld werd ontdekt tijdens de graafwerkzaamheden voor de bouw van een nieuw politiekantoor aan de Ter Duinenlaan in Koksijde (© agentschap Onroerend Erfgoed).

De gebouwen vormen samen één of twee boerderijen, waarvan de bewoners schapen hielden op hogere gronden in of nabij het intergetijdengebied aan de kust. Intrigerend was de vaststelling dat een grafveld deze bewoningsfase kort nadien – misschien zelfs deels gelijktijdig – opvolgde. De datering van het grafveld werd op basis van C¹⁴-analyses en contextuele gegevens bepaald op ca. 675 tot 750 na Chr. Binnen het opgegraven perceel troffen de archeologen in totaal 47 grafstructuren aan met menselijke skeletresten van 53 individuen.

Het botmateriaal verkeerde in een dermate staat van bewaring dat de weg opende voor een multidisciplinair onderzoek met onder meer isotopenanalyse, fysisch-antropologisch onderzoek en — voor het eerst op deze schaal in Vlaanderen — systematisch oudDNA-onderzoek (Larmuseau *et al.*, 2023).



Illustratie 2 In totaal werden restanten van 53 individuen uit de laat-Merovingische periode in Koksijde opgegraven (© agentschap Onroerend Erfgoed).

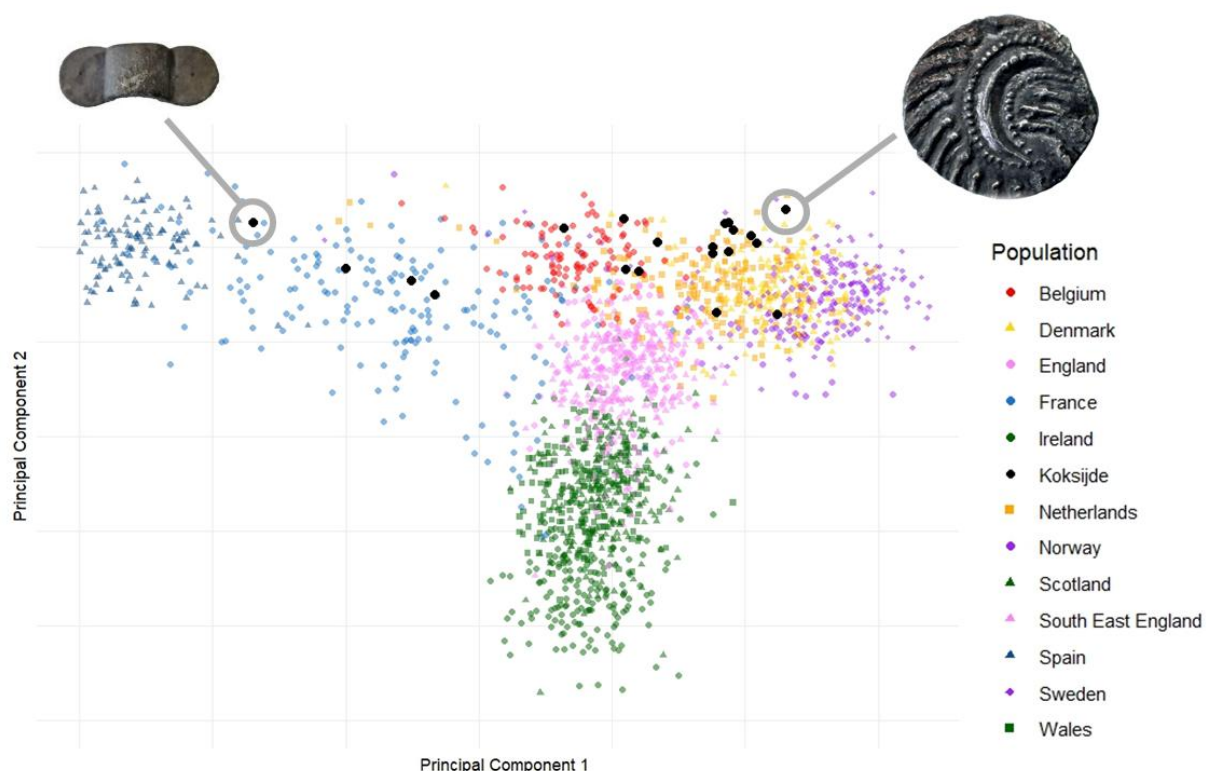
II. Afkomst & Verwantschap

De uitstekende staat van bewaring van het botmateriaal bood een unieke kans voor diepgaand genetisch onderzoek. Op basis van tanden en botresten konden we volledige genomen analyseren. Tot onze verrassing bleek de genetische diversiteit binnen dit relatief kleine grafveld opmerkelijk groot. De data toonden aan dat de site geen afgebakende familie-eenheid vertegenwoordigde, maar veeleer een open, sociaal diverse gemeenschap met individuen uit twee duidelijk onderscheiden afkomstgroepen. De genetische variatie op deze ene plek was zelfs groter dan die onder alle huidige autochtone Belgen (Larmuseau et al., 2023; Sasso et al., 2024).

Deze genetische bevindingen werden bovendien ondersteund door isotopenanalyse en archeologisch materiaal. Zo werd vastgesteld dat er twee hoofdgroepen aanwezig waren: enerzijds een groep met een *Noordzee-*

Germaanse genetische achtergrond, verwant aan tijdgenoten uit het huidige Nederland en Engeland; anderzijds een kleinere groep met een *Noord-Gallische* afkomst, verwant aan laat-IJzertijdpopulaties uit Noord-Frankrijk. De aanwezigheid van grafgiften zoals een zilveren sceatta uit Friesland en een mantelspeld die typerend is voor Noord-Frankrijk, weerspiegelt mogelijk deze herkomst, al blijft voorzichtigheid geboden in de interpretatie van dergelijke artefacten in relatie tot herkomst en etnische beleving.

Om de genetische variatie te visualiseren, gebruikten we verschillende statistische methoden, waaronder de principaal component analyse (PCA), een techniek die een soort genetische kaart oplevert (Illustratie 3) (Larmuseau *et al.*, 2023). Op zo'n kaart worden individuen gepositioneerd op basis van genetische gelijkenis: wie genetisch sterk op elkaar lijkt, ligt dicht bij elkaar; grotere genetische verschillen zorgen voor meer afstand op het plot. Wanneer we de 19 meest volledige genomen uit Koksijde projecteerden op een PCA met moderne West-Europese referentiepopulaties, bleek dat hun spreiding veel groter was dan die van de huidige Belgische cluster. En toch kwamen al deze profielen uit één en dezelfde plek onder het huidige politiekantoor van Koksijde.



Illustratie 3 Principaal component analyse (PCA) van de individuen uit de laat-Merovingische site in Koksijde (in het zwart), geprojecteerd op moderne West-Europese

populaties. Een mannelijk individu uit de Noordzee-Germaanse groep had een Friese munt als grafgift, terwijl een vrouwelijk individu uit de Noord-Gallische groep een mantelspeld had die typisch was voor Noord-Frankrijk.

Intrigerend is dat de genetische integratie van de twee groepen nog volop aan de gang was tijdens het gebruik van het grafveld. Zo werd onder meer een moeder-dochterpaar geïdentificeerd waarbij de moeder tot de Noord-Gallische groep behoorde, en de vader van haar dochter tot de Noordzee-Germaanse groep. Ook isotopenanalyse en skeletpathologie bevestigden sociale verschillen tussen beide groepen. Zo verschilden hun diëten, mede door genetische verschillen in het vermogen om melk te verteren op volwassen leeftijd. Daarnaast vertoonden individuen van de Noord-Gallische groep meer botslijtage, wat wijst op zwaarder fysiek werk tijdens hun leven.

Wat verwantschap betreft, bleken nauwe biologische relaties relatief zeldzaam. Enkel binnen de Noordzee-Germaanse groep werden verre verwantschappen vastgesteld; bij de Noord-Gallische individuen werden geen onderlinge genetische verbanden aangetroffen. Deze groep lijkt dus geïsoleerd begraven te zijn, wat mogelijk wijst op een andere sociale of geografische achtergrond.

III. Pathogenen

a) Methode

In het kader van het syntheseproject *Besiect ende Besmet* werd het volledige genetische materiaal van dertig menselijke individuen uit de Merovingische site van Koksijde onderzocht op de aanwezigheid van pathogenen via shotgun sequencing. Deze dertig genoom-profielen werden gerealiseerd in Sasso *et al.* (2024). Voor dit syntheseproject werd specifiek ook een metagenomische analyse op basis van de shotgundata uitgevoerd – met *metagenoom* bedoelen we het geheel van genetisch materiaal afkomstig van alle micro-organismen (zoals bacteriën en virussen) aanwezig in een staal. Deze analyse laat dus toe om naast menselijk DNA ook sporen van ziekteverwekkers terug te vinden, zelfs wanneer deze slechts in zeer lage

hoeveelheden aanwezig zijn. De sequencing data werden op meerdere punten tijdens de analyse onderworpen aan strenge kwaliteitscontroles met behulp van FASTQC (Simon, 2015) en MultiQC (Ewels *et al.*, 2016). De ruwe datasets werden vervolgens getrimd en gefilterd met cutadapt (parameters: -m 30 --nextseq-trim=20 --times 3 -e 0.2 --trim-n) (Martin, 2011), en paired-end datasets werden samengevoegd met behulp van FLASH (Magoč and Salzberg, 2011).

Voor de detectie van pathogenen in de metagenomische analyse werd KrakenUniq (Breitwieser, Baker and Salzberg, 2018) toegepast, in combinatie met een aangepaste referentiedatabase waarin 256 geselecteerde microbiële taxa en virale referenties uit onder andere de NCBI Viral Neighbor-database waren opgenomen (Brister *et al.*, 2015). Alle hits werden onderworpen aan E-valueberekeningen volgens de methodologie beschreven in Guellil *et al.* (2024). De aanwezigheid van pathogenen werd gevalideerd door de fragmenten te aligneren op de referentiegenomen met behulp van bwa (parameters: -n 0.04, -l 1000) (Li and Durbin, 2009), en verder verwerkt met samtools (Li *et al.*, 2009) en de Picard suite (Broad Institute, 2015). DNA-beschadigingsprofielen werden geëvalueerd met mapDamage2.0 (Ginolhac *et al.*, 2011) om de authenticiteit van oudDNA te verifiëren, en de gegenereerde alignments werden gevisualiseerd via aDNA-BAMPlotter (Guellil, 2024).

b) Algemene resultaten

Hoewel een vergelijkbare studie op een Merovingische site in Duitsland (Bonczarowska *et al.*, 2022) talrijke infectieuze agentia en co-infecties detecteerde, leverde onze metagenomische screening in Koksijde een heel ander resultaat op. In tegenstelling tot die Duitse site werden in Koksijde geen sporen van uitgebreide infectieziekten of co-infecties teruggevonden. Het blijft echter moeilijk om te bepalen of dit verschil te wijten is aan een werkelijk lagere aanwezigheid van pathogenen, aan het type weefsel dat bemonsterd werd (hoewel we verschillende type weefsels hebben bemonsterd van de Koksijdse populatie waaronder tanden, rotsbeen, gehoorbeentjes en tallus), aan verschillen in bewaringstoestand, of aan het soort pathogenen dat zich in het lichaam bevond.

Desondanks konden we in drie individuen duidelijke sporen van het **hepatitis B-virus (HBV)** aantonen:

- Individu KOS009 – mannelijk, behorend tot de Noord-Gallische afkomstgroep
- Individu KOS022 – mannelijk, behorend tot de Noordzee-Germaanse groep
- Individu KOS024 – vrouwelijk, behorend tot de Noordzee-Germaanse groep

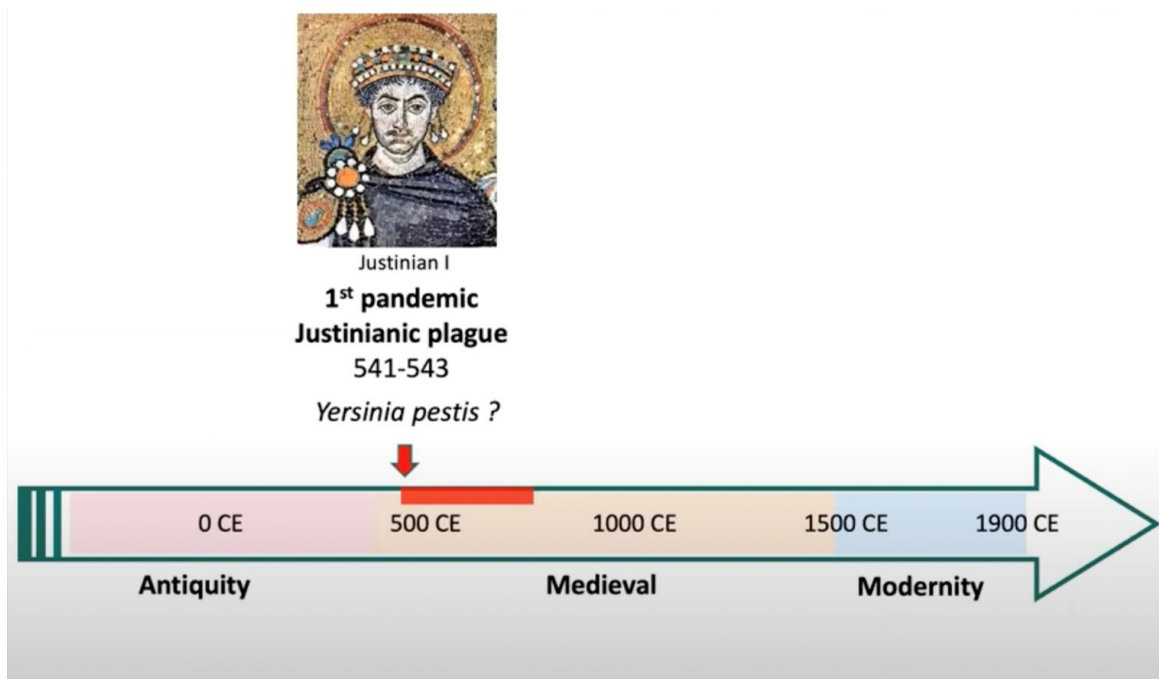
De laatste twee individuen bleken broer en zus te zijn op basis van genetische verwantschapsanalyse.

Het hepatitis B-virus is een DNA-virus dat leverontsteking veroorzaakt (Guellil *et al.*, 2024). Chronische HBV-infecties kunnen tot ernstige leveraandoeningen leiden, zoals cirrose of leverkanker. Besmetting vindt meestal plaats via bloed-bloedcontact of perinataal. Het virus circuleert al duizenden jaren onder de menselijke populatie en is ook eerder aangetroffen in oudDNA-onderzoeken in prehistorisch en middeleeuws Europa (Mühlemann *et al.*, 2018). De detectie van HBV bij deze drie individuen in Koksijde draagt bij aan ons groeiend inzicht in de historische verspreiding van dit virus.

Opmerkelijk is dat de HBV-positieve individuen tot beide genetische afkomstgroepen behoren — zowel Noordzee-Germaans als Noord-Gallisch — waardoor er geen duidelijke associatie zichtbaar is tussen infectiestatus en genetische achtergrond. Dit staat in contrast met andere verschillen tussen de groepen, zoals die in dieet, skeletpathologie en verwantschapsstructuur. Dat twee van de HBV-dragers bovendien broer en zus waren, wijst op een mogelijke familiale transmissie. Al blijft de steekproef klein, dit gegeven zou bij verdere studies van HBV-prevalentie in historische populaties aanvullende inzichten kunnen opleveren in de overdrachtdynamiek binnen sociale eenheden.

Een opmerkelijke afwezigheid in Koksijde was die van het **pestpathogeen *Yersinia pestis***, veroorzaker van de zogenaamde *Justiniaanse pest* die in de 6e tot 8e eeuw grote delen van het Byzantijnse rijk en Europa teisterde (Sarris, 2022). Ondanks het feit dat het grafveld binnen het chronologische bereik van deze pandemie valt, werd in geen enkel individu genetisch bewijs van de pestbacterie teruggevonden. Ook deze negatieve bevinding is waardevol, aangezien ze aanwijzingen biedt over de verspreidingsgrenzen en epidemiologische impact van deze pandemie in de regio Vlaanderen.

Samengevat toont de pathogenenanalyse in Koksijde dat, ondanks het ontbreken van brede infectiepatronen, individuele infecties zoals hepatitis B wel degelijk aanwezig waren, inclusief in een genetisch verwant gezin. Dit wijst op een laaggradige maar reële circulatie van virale ziektekiemen in een sociaal diverse kustgemeenschap tijdens de late 7e en vroege 8e eeuw.



Illustratie 4 Chronologisch kader van de Justiniaanse pest, met start in 541–543 na Chr., en veroorzaakt door *Yersinia pestis*. De begraafplaats van Koksijde valt in de rode periode waarin de Justiaanse pest in Europa heerste, maar leverde geen genetisch bewijs op voor de aanwezigheid van de pestbacterie. Bron figuur: aangepast op basis van wikimedia.

**Site 2: De middeleeuwse en vroegmoderne
begraafplaats op de Groenmarkt van Sint-Truiden (8^{ste}-
18^{de} eeuw)**



I. Achtergrond

Tijdens archeologisch onderzoek naar aanleiding van geplande stadsvernieuwingswerken in 2018–2020 op de Groenmarkt en het aanpalende Trudoplein in Sint-Truiden kwamen meer dan 3.000 menselijke graven aan het licht. Het bleek te gaan om een uitzonderlijk rijk gelaagde begraafsite, die bijna duizend jaar in gebruik was: van het einde van de 7de eeuw tot in de 18de eeuw. De vondst behoort tot de grootste archeologische opgravingen ooit uitgevoerd in een historische stadskern in Vlaanderen (De Winter, 2023).

De geschiedenis van de site is onlosmakelijk verbonden met de stichting van de Sint-Trudoabdij. Rond het midden van de 7de eeuw richtte Trudo — een edelman met kerkelijke opleiding uit Metz — op zijn familiedomein Sarchinium een kapel op en later een abdij. Na zijn dood groeide deze abdij uit tot een bedevaartsoord, waarbij zich steeds meer gelovigen, ambachtslieden en handelaars kwamen vestigen. Zo ontstond geleidelijk een nederzetting die zou uitgroeien tot de stad Sint-Truiden (Charles, 1966).



Illustratie 5 De opgravingen op de Groenmarkt in Sint-Truiden vonden plaats in de periode tussen 2018 en 2020. © Aron bv.

De begravingen op de Groenmarkt weerspiegelen deze evolutie. De oudste graven behoren tot de begraafplaats van de vroegmiddeleeuwse abdij (groep I: vóór 1000), gevolgd door latere graven die aansluiten bij de stedelijke parochiekerk, de Onze-Lieve-Vrouwekerk, gebouwd in de 11^{de} eeuw (groep II: 1000–1286). Vanaf de 13^{de} eeuw werd enkel nog begraven binnen het ommuurde kerkhof rond deze kerk. De chronologie werd nauwkeurig gereconstrueerd op basis van radiokoolstofdateringen, stratigrafie en archeologische context (Illustratie 6).



Illustratie 6 Overzicht van alle archeologische vondsten op de Groenmarkt en de twee heraangelegde zones van het Trudoplein. Elk rood streepje stelt een skelet voor, waarbij de positie van het hoofd door een kopje op het einde van het streepje wordt aangeduid. © Aron bv.

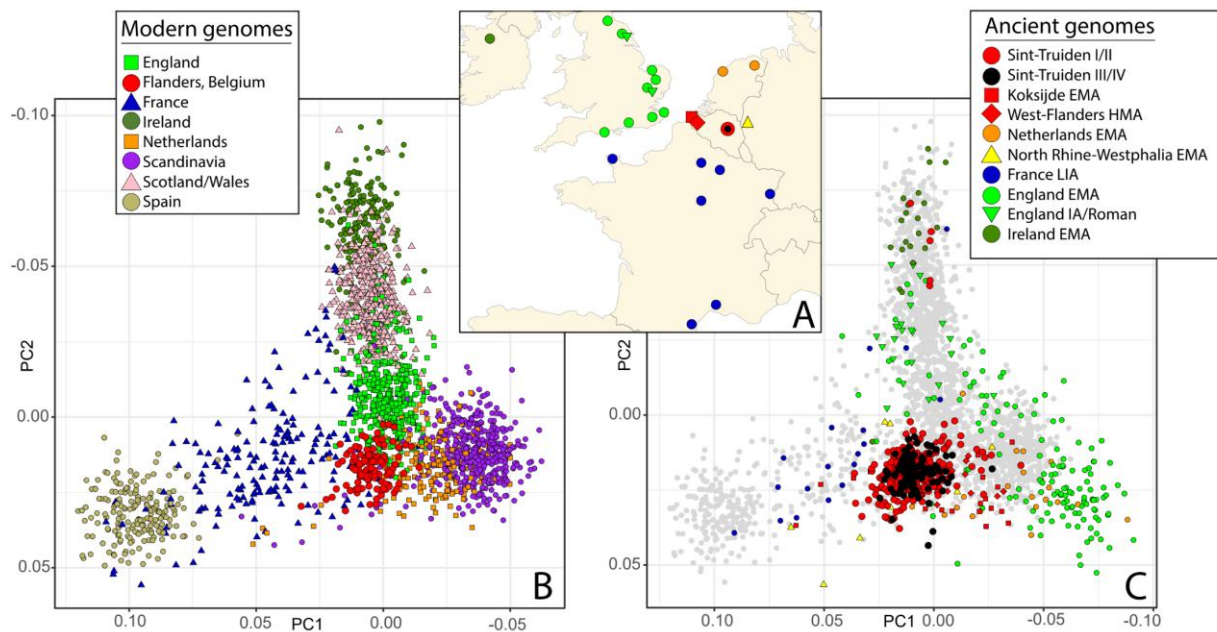
Opmerkelijk was de grote variatie in begravingstypes, waaronder meervoudige graven, antropomorfe houten kisten en zelfs een boomstamgraf. Het archeologisch team van Aron bv werd ondersteund door fysisch-anthropologen, wat toeliet om uitgebreide gegevens te verzamelen over leeftijd, geslacht, gezondheidstoestand en pathologie. De uitzonderlijke bewaring van het skeletmateriaal maakte ook isotopen- en genetisch onderzoek mogelijk.

In totaal werden 404 individuen geselecteerd voor oudDNA-analyse. Dankzij de combinatie van chronologische spreiding, uitzonderlijke densiteit en stedelijke ligging vormt de Groenmarkt in Sint-Truiden een uniek genetisch venster op de middeleeuwse en vroegmoderne bevolking in het hart van een Vlaamse stad. Het werd daarmee de grootste genetische studie ooit uitgevoerd op één archeologische locatie wereldwijd (Beneker *et al.*, 2025).

II. Afkomst & Verwantschap

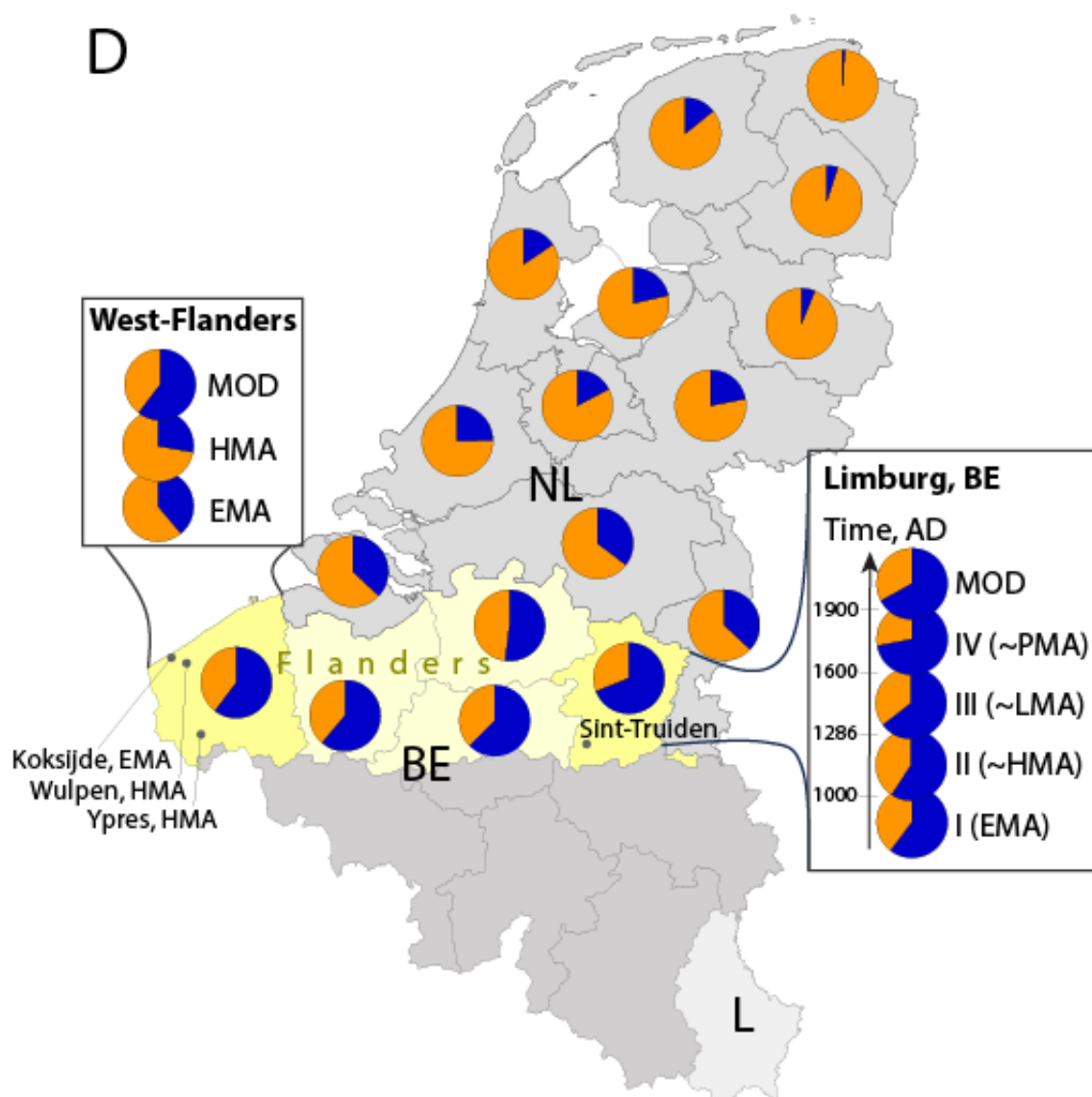
De genetische data van de 404 geanalyseerde individuen uit Sint-Truiden vormen samen een unieke tijdsdoorsnede van de bevolking van een stadskern over een periode van meer dan tien eeuwen. Op basis van de principaal component analysis (PCA) en modellen van genetische *admixture*, zoals qpAdm (Maier *et al.*, 2023) – methodes om de genetische samenstelling van populaties te schatten op basis van combinaties van voorouderlijke componenten – kon niet alleen de globale genetische spreiding in kaart gebracht worden, maar ook de temporele evolutie in afkomststructuur geanalyseerd worden.

In de oudste perioden — de vroege en volle middeleeuwen (groep I en II, ca. 700–1286) — was de genetische variatie erg groot en zelfs groter dan bij de huidige autochtone Belgische bevolking (Illustratie 7). Opvallend waren vijf individuen uit deze periode die genetisch nauw aansloten bij populaties uit Ierland en Schotland (Illustratie 7). Hun aanwezigheid — verspreid over het grafveld en zonder onderlinge verwantschap — wijst mogelijk op uitzonderlijke migratie maar historische bronnen uit die periode bieden geen verklaring voor hun aanwezigheid.



Illustratie 7 Bemonsteringslocaties en genetische afkomst van de bestudeerde populaties. (A) Kaart van de Noordzeeregio met archeologische sites uit de vroege (EMA) en volle (HMA) middeleeuwen, de Romeinse tijd en de late ijzertijd (LIA) die in de analyses werden gebruikt. (B–C) De principaal component analyses van geselecteerde moderne (B) en oude (C) genomen uit Europa. De stalen uit Sint-Truiden zijn in (C) onderverdeeld in periode I/II (ca. 700-1286; rood) en periode III/IV (1286-1800; zwart). Bron: Beneker *et al.* (2025).

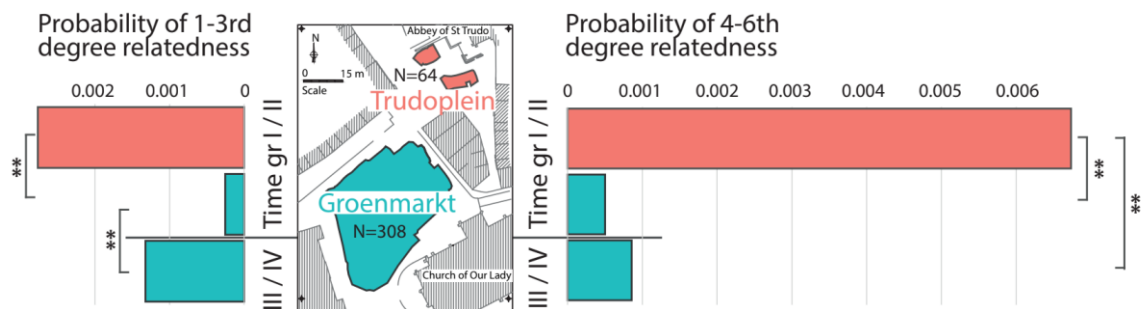
Uit *admixture*-analyses – methodes om te bepalen uit welke oudere genetische componenten een populatie is opgebouwd – blijkt dat de populatie van Sint-Truiden in de vroege middeleeuwen gemiddeld bestond uit ongeveer 63% ‘Gallische’ en 37% ‘Germaanse’ genetische componenten. Deze verhouding bleef verrassend stabiel doorheen de tijd, zelfs tot aan de huidige bevolking in de regio Limburg. In tegenstelling tot andere delen van Vlaanderen (zoals West-Vlaanderen), waar de Gallische component na verloop van tijd toenam, lijkt de genetische samenstelling in Sint-Truiden dus reeds vroeg in evenwicht te zijn gekomen en vervolgens structureel behouden (Illustratie 8). Deze twee ancestrale componenten zijn vandaag nog steeds herkenbaar in de autochtone bevolking van de Lage Landen en liggen zelfs aan de basis van de genetische noord-zuidgradiënt die vandaag nog steeds waarneembaar is in Vlaanderen en Nederland.



Illustratie 8 Deze kaart toont de proportie ‘Gallisch’ DNA (blauw) en ‘Germaans’ DNA (oranje) bij huidige inwoners van de provincies in Vlaanderen en Nederland. In de kaders zie je de evolutie voor West-Vlaanderen en Limburg: van de vroege middeleeuwen (EMA), volle middeleeuwen (HMA), late middeleeuwen (LMA), postmiddeleeuwen (PMA) tot de huidige populatie (MOD). Bron: Beneker *et al.* (2025).

De studie van verwantschapsstructuren leverde evenzeer opmerkelijke inzichten op. Ondanks het grote aantal onderzochte individuen werden slechts 17 nauwe verwantschappen vastgesteld (1ste–3de graad), waaronder slechts zes ouder-kind- of broer-zus-relaties. In vergelijking met andere stedelijke begraafplaatsen in Europa — zoals in Cambridge, waar verwantschap tot 80 keer frequenter werd aangetroffen — is dit bijzonder weinig (Hui *et al.*, 2024). Alleen in het oudste gedeelte van het grafveld, nabij

de abdij, werd een iets hogere concentratie aan verwanten aangetroffen (Illustratie 9). Daarnaast bleek in twaalf graven op de Groenmarkt die bestonden uit twee personen, geen enkele genetische verwantschap te bestaan tussen de samen begraven individuen. Het lijkt er dus op dat de toewijzing van graven in Sint-Truiden zelden gebeurde op basis van familieband, maar eerder bepaald werd door overlijdenstijdstip, status of locatie gebonden regels.



Illustratie 9 Overzicht van alle verwantschappen op de begraafplaatsen van het Trudoplein (rood) en de Groenmarkt (blauw) in verschillende tijdsperiodes (periode I-II = 700 – 1286; periode III-IV = 1286 – 1800). Links: kans op nauwe verwantschap (1ste–3de graad); rechts: kans op meer verre verwantschap (4de–6de graad). De ** wijst op statistisch significante verschillen na correctie voor multiple testing. Bron: Beneker *et al.* 2025.

III. Pathogenen

a) Methode

In het kader van het syntheseproject *Besiekt ende Besmet* werd het volledige genetische materiaal van 404 menselijke individuen uit de Groenmarkt-site in Sint-Truiden onderzocht op de aanwezigheid van pathogenen via shotgun sequencing. Deze genoomprofielen werden gegenereerd en geanalyseerd zoals beschreven in Beneker *et al.* (2025). Voor dit syntheseproject werd aanvullend een metagenomische analyse uitgevoerd op basis van de gegenereerde shotgundata.

De ruwe sequencingdata werden per staal samengevoegd en onderworpen aan kwaliteitscontrole met behulp van FASTQC (Simon, 2015). Vervolgens werden de reads getrimd en gefilterd met cutadapt (parameters: -m 30 --nextseq-trim=20 --times 3 -e 0.2 -j 0 --trim-n) (Martin, 2011), uitgevoerd in paired-end modus met de pair-filter ingesteld op “any”. Daarna werden de reads samengevoegd met behulp van FLASH2.0 (parameters: -z -M 125) (Magoč and Salzberg, 2011). De kwaliteit van de uiteindelijke datasets werd opnieuw beoordeeld met MultiQC (Ewels *et al.*, 2016).

Voor de detectie van pathogenen en potentieel opportunistische ziekteverwekkers (pathobionten) werd KrakenUniq (Breitwieser, Baker and Salzberg, 2018) gebruikt, met een aangepaste referentiedatabase die onder meer volledige genoom- en chromosoomassemblies bevatte van bacteriën, virussen, archaea en protozoa, samen met het humane genoom, de NCBI Viral Neighbor-database en de contaminantdatabases UniVec en EmVec (Cochrane and Galperin, 2010; Brister *et al.*, 2015).

De resultaten van KrakenUniq werden gevisualiseerd met heatmaps en tabellen, gegenereerd met behulp van Python modules *plotly*, *pandas*, *matplotlib* en *numpy* (Hunter, 2007; Plotly Technologies Inc, 2015; Harris *et al.*, 2020). E-values voor alle hits werden berekend volgens de methode beschreven in Guellil *et al.* (2024). Wegens de hoge sequentiediepte van de Sint-Truiden-datasets werd een E-value drempel van 0.006 gehanteerd voor verdere inspectie.

De detectie van pathogenen werd vervolgens gevalideerd door de reads te aligneren op de bijbehorende referentie genomen met behulp van bwa aln (parameters: -n 0.04 -l 1000) (Li and Durbin, 2009). De gegenereerde SAM-bestanden werden omgezet naar BAM-formaat, gesorteerd en gefilterd op gemapte reads met samtools (Li *et al.*, 2009). Duplicaten werden verwijderd met de MarkDuplicates-module van Picard (Broad Institute, 2015).

DNA-schadepatronen werden geëvalueerd met mapDamage2.0 om de authenticiteit van oudDNA te verifiëren (Ginolhac *et al.*, 2011). Alignments werden gevisualiseerd met aDNA-BAMPlotter (Guellil, 2024), en mappingstatistieken werden berekend met Qualimap (García-Alcalde *et al.*, 2012).



Illustratie 10 Bemonstering voor DNA-onderzoek in het GAZO depot in Sint-Truiden. Bron: GAZO.

b) Algemene resultaten

De metagenomische screening van 372 genoomprofielen uit Sint-Truiden op sporen van menselijke ziekteverwekkers leverde bij 33 individuen aanwijzingen op voor de aanwezigheid van pathogene micro-organismen. Uiteraard ging het vaak om lage hoeveelheden pathogeen-DNA, waardoor volledige validatie op basis van sequentiedekking niet altijd mogelijk was. Deze resultaten bieden een venster op het spectrum van infectieziekten dat circuleerde in de stadskern van Sint-Truiden tussen de 8ste en 18de eeuw.

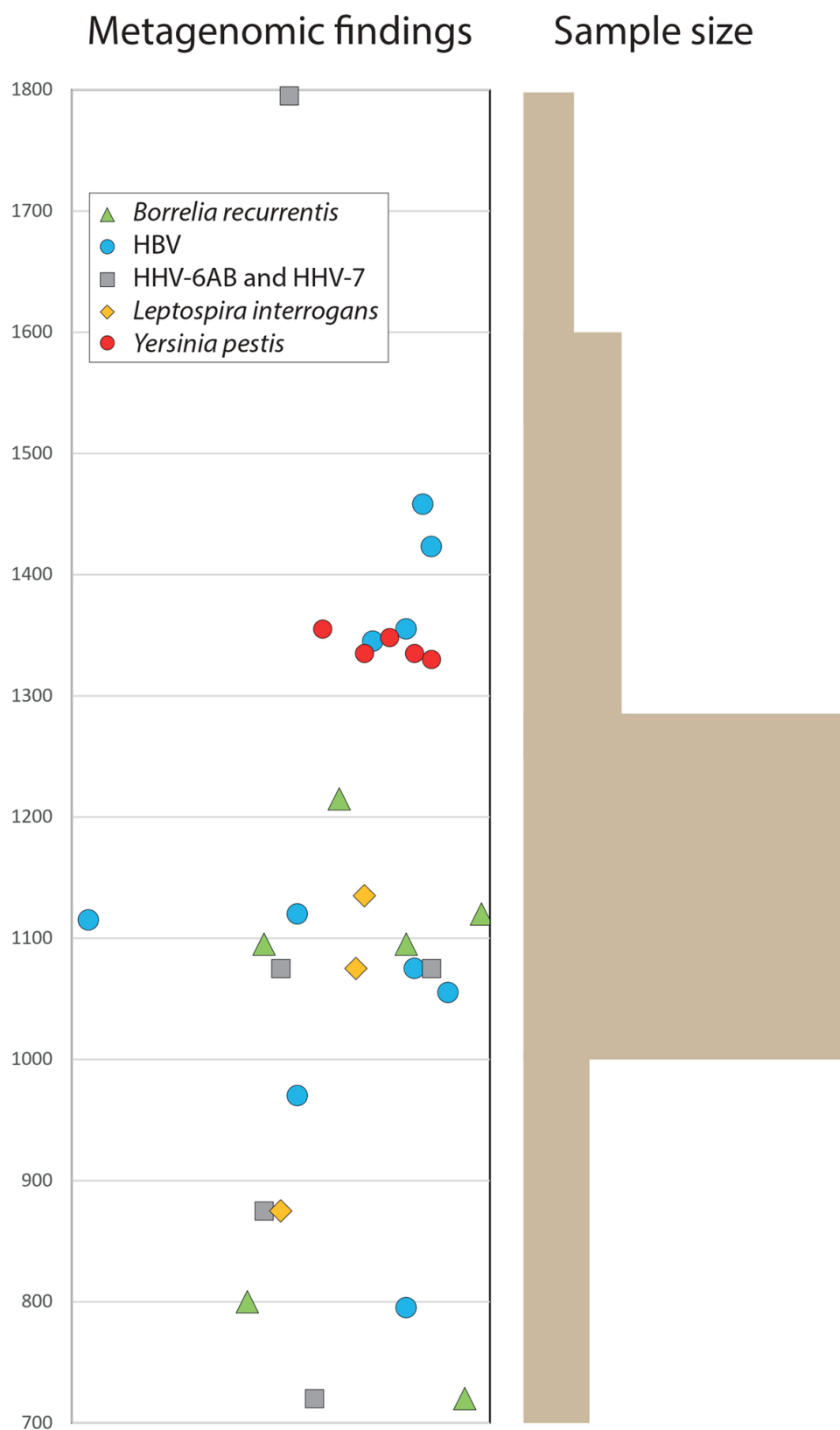
De bevindingen betroffen:

- 10 individuen met **hepatitis B-virus (HBV)**, met dateringen verspreid tussen ca. 800 en 1450 na Chr.

- 5 individuen met ***Yersinia pestis***, allemaal gedateerd in de 14de eeuw, overeenkomend met de periode van de Zwarte Dood.
- 6 individuen met ***Borrelia recurrentis***, het bacteriële agens van terugkerende koorts, met dateringen tussen 700 en 1200 na Chr.
- 3 individuen met ***Leptospira interrogans***, de bacterie die leptospirose veroorzaakt, eveneens beperkt tot 850–1150 na Chr.
- 5 individuen met **menselijke herpesvirussen (HHV-6A, HHV-6B of HHV-7)**, verspreid over de volledige chronologische reikwijdte van de site.
- Daarnaast werd ook ***herpes simplex virus 1 (HSV-1)*** aangetroffen bij 2 individuen, en 8 andere **bacteriële of virale signalen** bij telkens één individu.

Twee individuen vertoonden zelfs een co-infectie: individu ST1319 vertoonde een co-infectie van *Yersinia pestis* en HBV; individu ST0815 vertoonde een co-infectie van *Yersinia pestis* en *Streptococcus sanguis*. Dit sluit aan bij eerdere observaties in andere middeleeuwse populaties, waar chronische infecties konden samenvallen met acute epidemische pathogenen (Coppola Bove *et al.*, 2024).

In Illustratie 11 zijn de volgende bevindingen duidelijk terug te vinden: *Yersinia pestis* manifesteerde zich vrij plots en doelgericht in de 14de eeuw, terwijl andere pathogenen zoals HBV, *Borrelia recurrentis* en *Leptospira interrogans* in oudere lagen van de site aangetroffen werden. Herpesvirussen kwamen dan weer voor over de volledige tijdsperiode heen — een patroon dat aansluit bij hun levenslange persistentie en endemische verspreiding binnen menselijke populaties.



Illustratie 11 Chronologische spreiding van de metagenomische bevindingen. Individuen met pathogeenbevindingen en beschikbare ^{14}C -dateringen worden weergegeven voor de subset van pathogenen die minstens twee keer werden aangetroffen. Op de y-as staat de gemiddelde waarde van het 95%-betrouwbaarheidsinterval van de ^{14}C -datering per

individue; de x-as toont de overeenkomstige $\delta^{15}\text{N}$ -waarden. De rechterzijde van het figuur toont de hoeveelheid stalen beschikbaar voor metagenomische analyse overheen de tijd.

c) *Yersinia pestis*

Het genetisch onderzoek leverde het allereerste directe bewijs op van een pestepidemie in middeleeuws Vlaanderen. In het skeletmateriaal van vijf individuen uit Sint-Truiden, allen gedateerd in de 14de eeuw, werd DNA van de pestbacterie *Yersinia pestis* aangetroffen. Twee bijkomende individuen vertoonden ook sporen van de bacterie, al was het bewijs daarvoor minder sluitend (zij werden daarom niet meegenomen in de verdere analyse en discussie). De slachtoffers van de **pest** lagen verspreid begraven op het kerkhof van de Groenmarkt, in individuele graven, en dus niet in massagraven zoals vaak verwacht wordt bij epidemieën.

Opmerkelijk is dat **geen enkele geschreven bron uit 14de-eeuws Sint-Truiden** melding maakt van een pestuitbraak: niet de doorgaans gedetailleerde abdijkroniek, noch de stedelijke administratie. Pas in het begin van de 15de eeuw verschijnen in documenten van de stedelijke administratie zoals de '*maandagboeken*' vage verwijzingen naar oversterfte (Weeda, 2022). Het genetisch bewijs toont aan dat de afwezigheid van schriftelijke bronnen geenszins de afwezigheid van ziekte betekent. Het plaatst Sint-Truiden mee op de kaart van de steden waar de pest al wél woedde in de 14de eeuw — en dit in tegenstelling tot wat lang gedacht werd over de Zuidelijke Nederlanden (Roosen and Curtis, 2019).

Bij twee van de pestslachtoffers werd een **co-infectie** vastgesteld: individu ST1319 met *Y. pestis* en hepatitis B-virus (HBV), en individu ST0815 met *Y. pestis* en *Streptococcus sanguis*. Zulke gevallen sluiten aan bij eerdere bevindingen uit middeleeuws Europa, waarbij chronische infecties samenvielen met acute epidemieën. Daarnaast bleken twee volwassen mannen met pest-DNA, begraven op verschillende locaties binnen de site, genetisch verwant in tweede graad en dezelfde mitochondriale haplogroep te delen — een aanwijzing voor familiale verspreiding binnen een bredere epidemie.

Voor individu ST1516 — het sample met de hoogste detectiegraad voor *Y. pestis* — werd aanvullend een **doelgerichte verrijking** uitgevoerd met een *myBaits*-kit gericht op *Y. pestis* en *Y. pseudotuberculosis*. Verrijking is een laboratoriumtechniek waarbij met behulp van ‘probes’ doelgericht gezocht wordt naar DNA-fragmenten van een specifiek micro-organisme binnen een staal oud DNA. Hoewel ook bij andere individuen met *Y. pestis* een verrijking werd geprobeerd, kon enkel bij ST1516 voldoende *Y. pestis* fragmenten worden geïsoleerd om individuele mutaties te observeren. Bij deze persoon werden twee genetische substituties geïdentificeerd die afwezig zijn bij Zwarte Dood-stammen, maar wel voorkomen in latere stammen uit de bredere ‘Second Plague Pandemic’-lijn. Dit wijst erop dat ST1516 niet tijdens de eerste golf van de Zwarte Dood stierf, maar bij een latere epidemie in de 14de eeuw.

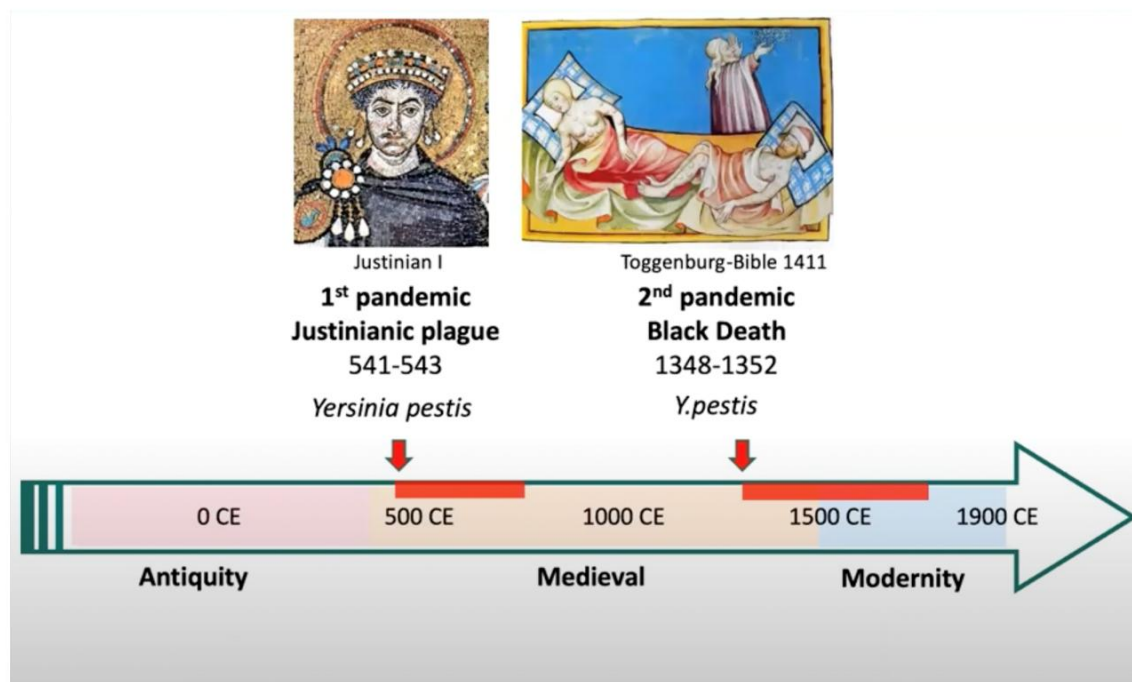
De doelgerichte DNA-verrijking werd gerealiseerd met behulp van een custom *myBaits* target enrichment kit (versie 4) van Daicel Arbor Biosciences, gericht op *Y. pestis* en *Y. pseudotuberculosis*. De verrijking werd uitgevoerd volgens het *myBaits* v5-protocol, met uitzondering dat slechts een halve bait-aliquot werd gebruikt. De uiteindelijke bibliotheek werd geamplificeerd met KAPA HiFi HotStart DNA Polymerase (IS5- en IS6-primers), en gesequeneerd op een NextSeq500 (MID150, paired-end) aan de Estonian Biocenter Core Facilities (Universiteit van Tartu).

Interessant is dat bijna **10% van de metagenomisch gescreende individuen** uit de periode 1286–1600 pest-DNA vertoonden. Gezien de lage detectiegraad van *Y. pestis* in oudDNA — zelfs bij hoge sequentiediepte — is het mogelijk dat nog meer individuen pestslachtoffers waren, maar onder de detectiedrempel bleven. Dit versterkt de hypothese van een bredere maar thans onzichtbare impact van de pestepidemie in Sint-Truiden.

Toch blijkt de **genetische impact van deze epidemie** op de populatie relatief beperkt. Er werden geen significante verschuivingen gevonden in de frequentie van immuniteitsgenen vóór en na de pestperiode. In tegenstelling tot bevindingen in Londen en Denemarken (zoals gerapporteerd door Klunk *et al.* maar intussen gecontesteerd voor methodologische problemen (Klunk *et al.*, 2022; Barton *et al.*, 2023)), vonden we geen aanwijzingen voor grootschalige natuurlijke selectie op aangeboren immuniteit. Dat er geen significante verschuivingen werden gevonden in de frequentie van

immuunitetsgenen vóór en na de pestperiode betekent geenszins dat er destijds weinig slachtoffers vielen, integendeel. Het wijst er vooral op dat er geen genetische aanleg was die bescherming bood tegen de pest. Hierbij maken we wel de kanttekening dat er wel enkele genetische varianten naar voren kwamen die mogelijk toch betrokken zijn bij immuunrespons, maar geen statistisch significant resultaat gaven — waaronder een variant in het **PLCE1-gen** (geassocieerd met T-celactiviteit en monocytentellingen) en in **KLHL29** (geassocieerd met lymfocytentellingen). Deze varianten zijn interessante targets voor toekomstig functioneel onderzoek.

Samengevat leveren de bevindingen uit Sint-Truiden niet alleen het oudste genetische bewijs voor pest in Vlaanderen, maar illustreren ze ook hoe genetisch en archeologisch onderzoek verborgen ziektegeschiedenissen kan ontsluiten, zelfs in afwezigheid van geschreven bronnen. De afwezigheid in schriftelijke bronnen is dus ook géén bewijs voor de afwezigheid van een epidemie. Dat deze slachtoffers begraven werden volgens reguliere begrafenisnormen en niet in noodgraven – zoals vaak gedacht wordt bij massagraven of meervoudige graven – wijst mogelijk op een langzamer voortschrijdende sterftegolf of op religieus-sociale overtuigingen die rituele begraafing bleven vereisen, zelfs tijdens een epidemie.



Illustratie 12 Chronologisch kader van de Justiniaanse pest en de tweede pandemie met de Zwarte Dood en daaropvolgende pestuitbraken, die allen veroorzaakt zijn door *Yersinia pestis*. De begraafplaats van Sint-Truiden valt in de twee rode periodes waarin de pest in

Europa heerste, maar leverde enkel voor de 14^{de} eeuw genetisch bewijs op voor de aanwezigheid van de pestbacterie. Bron figuur: aangepast op basis van wikimedia.

d) *Borrelia recurrentis*

Bij zes individuen uit Sint-Truiden, gedateerd tussen de 8ste en 13de eeuw, werden sporen aangetroffen van *Borrelia recurrentis*, de spiraalvormige bacterie die de infectieziekte “**terugkerende koorts**” veroorzaakt. Deze ziekte wordt overgedragen via de menselijke klierluis (*Pediculus humanus humanus*) en manifesteert zich in golven van hoge koorts. De infectie kon ernstig of zelfs fataal verlopen, zeker bij verzwakte of ondervoede personen.

De aanwezigheid van *B. recurrentis* is klinisch en historisch van groot belang. Tot vandaag komt deze ziekte nog enkel voor in de vorm van epidemieën in delen van Oost-Afrika, maar in het verleden was ze wijdverspreid in Europa. Historische bronnen beschrijven herhaaldelijke uitbraken van terugkerende koorts vanaf de middeleeuwen tot in de 19de eeuw, vaak in verband met oorlogen, vluchtelingenkampen of stedelijke armoede (Lopez, Hovius and Bergström, 2021). Tot voor kort was directe genetische bevestiging van deze ziekte in Europa enkel aangetoond bij middeleeuwse individuen uit Scandinavië en Groot-Brittannië (Swali *et al.*, 2025).

De bevinding in Sint-Truiden vormt daarmee het **eerste directe bewijs van de verspreiding van *B. recurrentis* in de middeleeuwse Lage Landen**. Omdat deze bacterie uitsluitend via klierluizen wordt overgedragen, wijst haar aanwezigheid op problematische hygiënische omstandigheden binnen de stedelijke nederzetting. Ze levert dus ook indirect inzicht in de sociale context en levensomstandigheden van de middeleeuwse stadsbevolking, in het bijzonder wat betreft overbevolking, sanitaire voorzieningen en publieke gezondheid.

e) *Leptospira interrogans*

Bij drie individuen, gedateerd tussen ca. 850 en 1150 na Chr., werden sporen aangetroffen van *Leptospira interrogans*, de bacterie die verantwoordelijk is

voor **leptospirose**. Het gaat om een spiraalvormige bacterie die via de urine van besmette dieren — met name ratten, maar ook vee — in het milieu terechtkomt. Infectie bij de mens gebeurt meestal via contact met besmet water of modder, vaak via huidwonden of slijmvliezen. Om die reden staat leptospirose ook wel bekend als de "**rattenziekte**".

De ziekte kan bij mensen leiden tot ernstige symptomen zoals hoge koorts, nier- en leverfalen, longproblemen en in sommige gevallen zelfs de dood. De aanwezigheid van *Leptospira* in middeleeuws Sint-Truiden wijst op onhygiënische leefomstandigheden, gebrekkige afwatering of sanering, en nauwe interactie tussen mensen en dieren in de stedelijke context. In combinatie met de vastgestelde aanwezigheid van *Borrelia recurrentis* (overgedragen door klierluizen), vormen deze bevindingen een duidelijke aanwijzing dat de volksgezondheid in het middeleeuwse Sint-Truiden sterk beïnvloed werd door de levensomstandigheden in een drukbevolkte stad. Het was dus lang niet altijd even proper in middeleeuws Sint-Truiden.

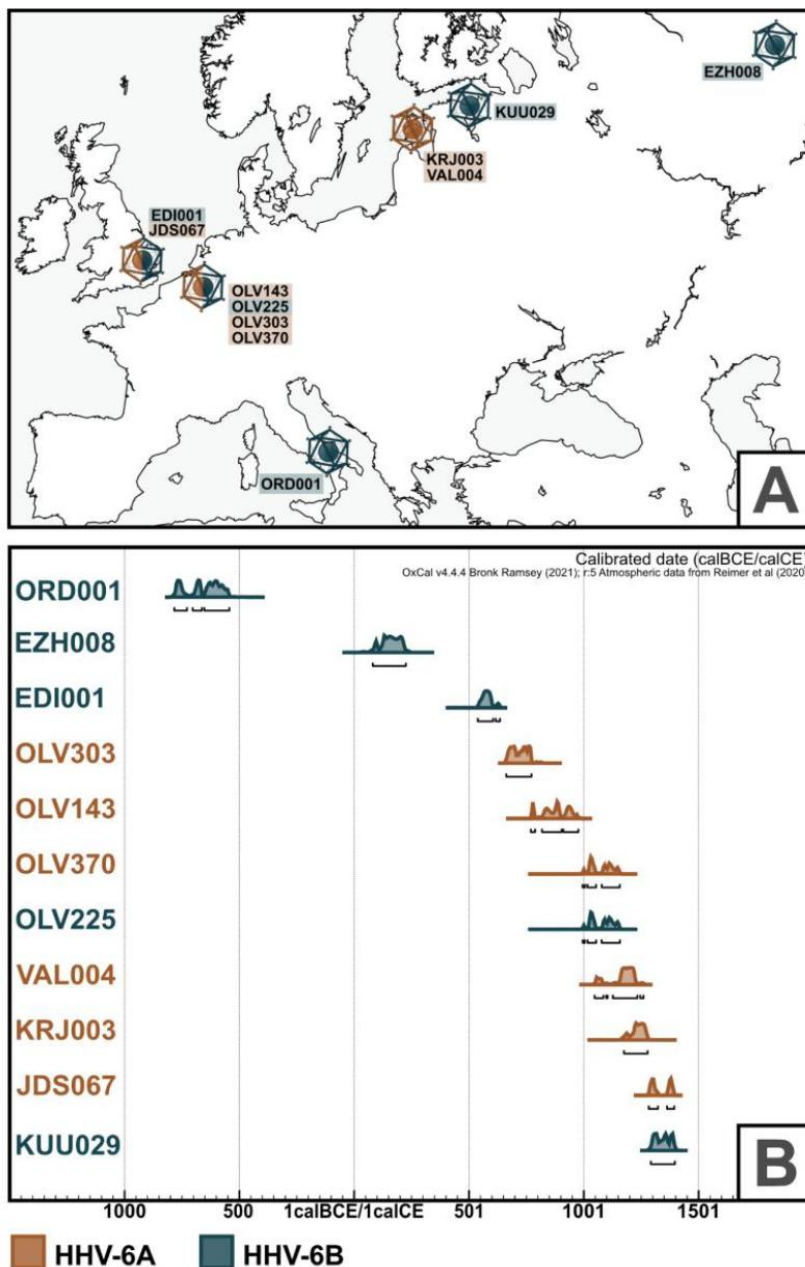
f) Betaherpesvirus 6A en 6B

Bij vier middeleeuwse individuen uit Sint-Truiden (OLV143, OLV225, OLV303 en OLV370) werd DNA aangetroffen van *human betaherpesvirus 6* (HHV-6), een virus dat pas in de jaren 1980 werd ontdekt maar vermoedelijk al veel langer deel uitmaakt van het menselijke viroom (wat ook al blijkt op basis van deze vaststelling). Dit virus veroorzaakt bij kinderen de veelvoorkomende "**zesde ziekte**" (roseola infantum), maar kan bij verzwakte personen (zoals ouderen of mensen met een onderliggend immuundefect) aanleiding geven tot ernstigere symptomen, variërend van koortsaanvallen tot hersenontstekingen.

Wat HHV-6 uniek maakt onder de humane herpesvirussen is het vermogen om zich te integreren in het menselijk genoom. Bij de meerderheid van de infecties gebeurt dit enkel in somatische cellen (lichaamscellen), maar in zeldzame gevallen vindt integratie plaats in de kiembaan. Zo kan het virus als erfelijke sequentie worden doorgegeven aan nakomelingen. Men spreekt in dat geval dan van *inherited chromosomally integrated* HHV-6 (iciHHV-6). Bij zo'n integratie is het volledige virale DNA aanwezig in alle cellen van het

lichaam, inclusief tand- en botweefsel — wat het uitzonderlijk detecteerbaar maakt via oudDNA-analyse.

Dankzij het syntheseproject *Besiect ende Besmet* maken de stalen uit Sint-Truiden – samen met zeven andere stalen uit vier andere Europese sites – deel uit van de eerste studie wereldwijd waarin volledige oude genomen van HHV-6A en HHV-6B werden gereconstrueerd (Guellil *et al.*, 2024). Bij deze vier Truiense individuen werden de virale genomen succesvol verrijkt en volledig gesequeneerd. Drie dragen HHV-6A (OLV143, OLV303 en OLV370) en één HHV-6B (OLV225). Via fylogenetische analyse (zie Illustraties 14 en 15) konden deze virale genomen ingedeeld worden in subgroepen op basis van het integratielocus in het menselijk genoom – dat is de specifieke plaats op een chromosoom waar het volledige virale DNA is ingebouwd en vervolgens wordt overgeërfd. Zo viel OLV303 in de HHV-6A-subgroep A3, waarvan geweten is dat het virus integreert in chromosoom 19p. OLV143 en OLV370 maken dan weer deel uit van clade A4, waarvan geweten is dat het virus integreert in chromosoom 18q. Staal OLV225, het enige individu met HHV-6B, kon niet eenduidig aan een bekende integratielijn gekoppeld worden, wat suggereert dat bepaalde virale stammen nog onvoldoende zijn vertegenwoordigd in huidige databanken.

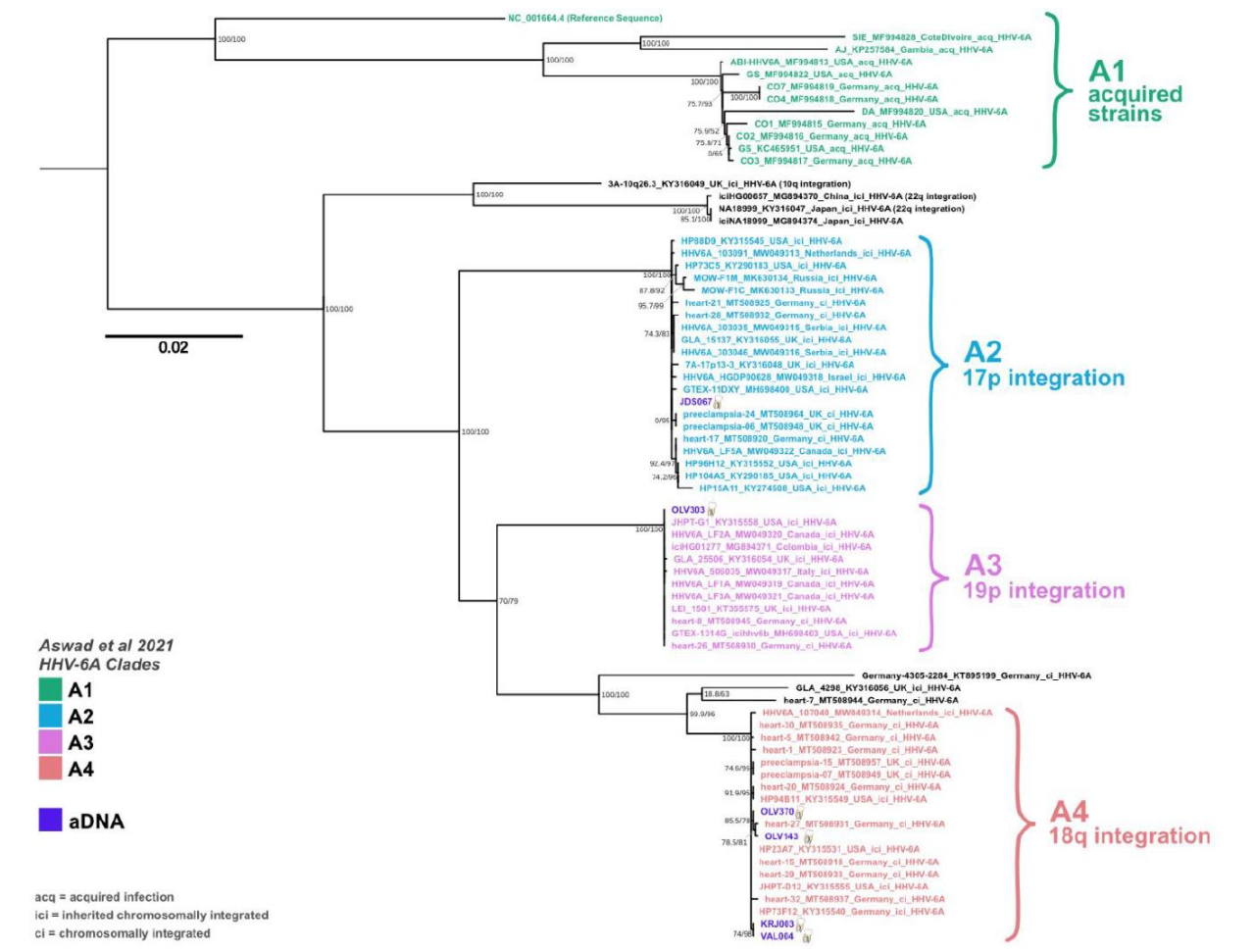


Illustratie 13 Tijdelijke en geografische spreiding van de onderzochte stalen. A) Kaart van Europa met aanduiding van alle bemonsteringslocaties en de types van humaan betaherpesvirus 6 (HHV-6) die op elke site werden aangetroffen. B) OxCal-grafiek met de gekalibreerde C14-dateringen van alle stalen die in deze studie zijn opgenomen. De data worden weergegeven in cal voor Chr./na Chr.

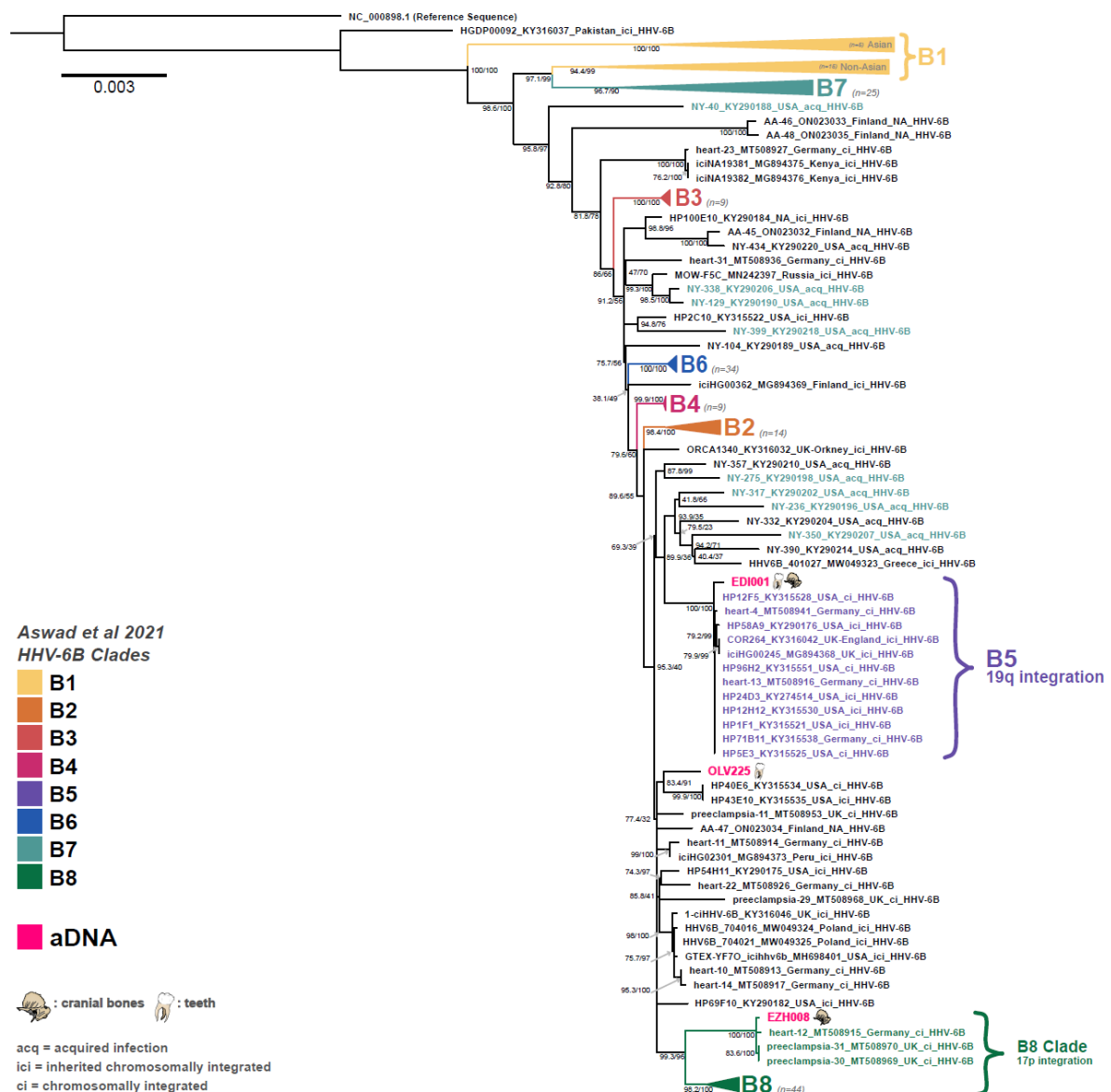
Een kaart en dateringsgrafiek (Illustratie 13) tonen hoe deze virale genomen uit Sint-Truiden zich temporeel situeren tussen de 8ste en 12de eeuw, en geografisch situeren bij andere vondsten uit Engeland, Estland, Rusland en Italië. Opvallend is dat Sint-Truiden de enige locatie is waar zowel HHV-6A als HHV-6B werd aangetroffen in dezelfde historische populatie — een unicum

dat (hoogstwaarschijnlijk) komt doordat er uitzonderlijk veel stalen van deze site genetisch zijn geanalyseerd.

De aanwezigheid van geïntegreerde herpesvirussen in het middeleeuwse Sint-Truiden bevestigt dat deze virussen reeds lang circuleren binnen Europese populaties. De fylogenetische structuren van deze oude virussen blijken immers perfect inpasbaar in de moderne classificaties, wat suggereert dat de meeste genetische diversiteit van HHV-6 reeds vóór de 14de eeuw aanwezig was.



Illustratie 14 Fylogenetische stamboom van *Human betaherpesvirus 6A*. Midpoint-gewortelde maximum likelihood-fylogenie gebaseerd op 66 moderne en zes oude genomen van HHV-6A. De knooppuntlabels tonen de SH-aLRT-steun (%) en ultrafast bootstrap-steun (%) op basis van telkens 10.000 replicaties in IQ-Tree2 (Minh et al., 2020). De labels zijn ingekleurd volgens cladegroepen; de integratielocaties zijn weergegeven zoals gedefinieerd in Aswad et al. (2021). De oudDNA-stalen zijn aangeduid in paars en in het vet. Virusstammen worden enkel als *ici* aangeduid wanneer erfelijke integratie (*inherited chromosomally integrated*) effectief werd vastgesteld.



Illustratie 15 Fylogenetische stamboom van *Human betaherpesvirus 6B*. Maximum likelihood-fylogenie gebaseerd op 214 moderne en drie oude genomen van HHV-6B, geworteld op de referentiesequentie. Knoopuntlabels tonen de SH-aLRT-steun (%) en ultrafast bootstrap-steun (%) op basis van telkens 10.000 replicaties in IQ-Tree2 (Minh et al., 2020). De labels zijn ingekleurd volgens cladegroepen; de integratielocaties zijn weergegeven zoals gedefinieerd in Aswad et al. (2021). De oudDNA-stalen zijn aangeduid in roze en in het vet, met illustraties van het type staal (tand of bot) waaruit het genoom werd gerecupereerd. Virusstammen worden enkel als *ici* aangeduid wanneer erfelijke integratie (*inherited chromosomally integrated*) effectief werd vastgesteld.

Hoewel het onderzoek vooral focuste op HHV-6A en HHV-6B, werd bij één individu uit Sint-Truiden ook *Human betaherpesvirus 7* (HHV-7) aangetroffen. HHV-7 is net als HHV-6 een veelvoorkomend virus dat meestal in de kindertijd wordt opgelopen en levenslang in het lichaam aanwezig blijft. De infectie verloopt meestal mild of asymptomatisch, maar kan bij personen met een verzwakt immuunsysteem opnieuw actief worden. De genetische data voor HHV-7 in deze studie bleven beperkt tot enkele metagenomische sporen, zonder verdere fylogenetische analyse. Niettemin vormt dit de eerste bevestiging van de aanwezigheid van HHV-7 in een historische Europese context via oudDNA.

Deze bevindingen tonen niet alleen de waarde van oudDNA-onderzoek voor de reconstructie van virale evolutie, maar illustreren ook hoe verborgen elementen van het menselijke genoom — zoals geërfde virale integraties — nieuwe inzichten kunnen bieden in de evolutie van pathogenen. Zo worden virussen, net als hun menselijke gastheren, deel van de genetische erfenis van het verleden.

Site 3 & 4: Het kerkhof van de leprozerie ‘Hooge Siecken’ in Sint-Jan, Ieper (13^{de}-14^{de} eeuw) & het kerkhof van de Sint-Niklaasparochie in Ieper (1200-1350)



I. Achtergrond kerkhof van Hooge Siecken in Sint-Jan, Ieper

Aan de rand van Ieper, in de huidige deelgemeente Sint-Jan, bevond zich vanaf de 13de eeuw een van de belangrijkste leprozerieën van het graafschap Vlaanderen: de leprozerie gekend als de ‘Hooge Siecken’ (Illustratie 16). De instelling werd vermoedelijk rond 1235 opgericht (zeker vóór 1236) en bleef in gebruik tot omstreeks het midden van de 17de eeuw. Ze behoorde tot de drie hoofdleprozerieën van het graafschap Vlaanderen (dat geografisch niet overeenstemde met het huidige Vlaanderen), naast die van Gent en Brugge (Bradt, Vanhoutte and Couchez, 2021).



Illustratie 17 De 'Hooge Siecken' zoals weergegeven in de Flandria Illustrata door Sanderus (1641-1644). Bron: Stadsarchief Ieper, Kaarten en plannen, 127.

Tijdens de voorbereide graafwerken voor de aanleg van een verkaveling langs de Groenestraat werd een archeologische toevalsvondst gemeld. In 2019–2020 werd daarop een grootschalige opgraving uitgevoerd op initiatief van het agentschap Onroerend Erfgoed. Daarbij kwamen sporen aan het licht van verschillende bouwfases van de leprozerie, waaronder muren, vloerniveaus met tegelhaarden, greppels en waterputten. Ook de bijhorende begraafplaats kon deels worden opgegraven. Voor het eerst kon in Vlaanderen een leprozerie-site in haar volle ruimtelijke context archeologisch worden onderzocht (Illustratie 18).



Illustratie 18 De archeologische opgravingen op de site van de leprozerie Hooge Siecken in Sint-Jan bij Ieper. © agentschap Onroerend Erfgoed.

Aan de rand van de site, in de nabijheid van de huidige kerk en het kerkhof, werd een zone blootgelegd die met zekerheid tot het kerkhof van de leprozerie behoorde. Een oorkonde bevestigt dat dit kerkhof in 1274 werd gewijd (Vanhoutte *et al.*, 2021). Aangezien verscheidene graven werden doorsneden door latere muren van een hoeve uit de 17de eeuw, konden ze met zekerheid worden toegeschreven aan de actieve periode van de leprozerie (13de–17de eeuw). In totaal werden **154 menselijke skeletten** geborgen, verspreid over **vijf verschillende begravingsniveaus**. Dit wijst op een langdurig en herhaald gebruik van het terrein als begraafplaats, waarbij over generaties heen op nagenoeg dezelfde plek werd begraven. Het ging om een diverse populatie met mannen, vrouwen en kinderen (Illustratie 19). Vijftien individuen die representatief zijn voor de hele begraafplaats, werden via C14 gedateerd. Alle individuen werden gedateerd tussen 1260-1410 (rekening houdend met alle 95% betrouwbaarheidsintervallen), uitgezonderd één individu dat gedateerd werd tussen 1150-1270 (analyses uitgevoerd door KIK/IRPA i.o.v. agentschap Onroerend Erfgoed; mondelinge informatie Sofie Vanhoutte). Gegeven deze C14-dateringen worden alle opgegraven skeletten toegewezen aan de eerste fasen van de leprozerie van de 13^{de} en 14^{de} eeuw.



Illustratie 19 Een deel van de begraafplaats van de Hooge Siecken werd opgegraven. © agentschap Onroerend Erfgoed.

Niet alle begraven individuen waren noodzakelijk leprapatiënten. Vermoedelijk liggen hier ook gezonde *prebendarii* begraven: verzorgers, personeel en weldoeners die verbonden waren aan de instelling. De dagelijkse leiding van de leprozerie was in handen van een meester, aangesteld onder toezicht van twee stadsvoogden. Zoals in vele middeleeuwse leprozerieën was opname vaak ook mogelijk mits betaling. Vanaf 1353 gold een beperking op het aantal gezonde bewoners in de Hooge Siecken: maximaal zes gezonden, waaronder een meester, brouwer, twee boeren en twee rentmeesters (Vanhoutte *et al.*, 2021).

Na de opheffing van de leprozerie in de 17de eeuw werd het terrein omgevormd tot landbouwsite (Illustratie 20). Een vierkantshoeve bleef nog eeuwen zichtbaar op kaarten uit de 18de en 19de eeuw, en was actief tot de Eerste Wereldoorlog. Tijdens de Groote Oorlog werden ook deze constructies grotendeels verwoest. Archeologische sporen uit deze recentere periode, zoals shelters, puinlagen en bomkraters, maken van de site een gelaagd historisch landschap.



Illustratie 20 Een goed bewaard skelet van een 20-40 jaar jonge man werd overbouwd door een muur van de 17^{de}-eeuwse hoeve. © agentschap Onroerend Erfgoed.

Vandaag vormt *Hooge Siecken* een uitzonderlijk goed bewaarde getuige van middeleeuwse omgang met besmettelijke ziekten en sociaal-religieuze uitsluiting. Waar historische bronnen doorgaans vaag of stil blijven over de dagelijkse realiteit in dergelijke instellingen, werpt de combinatie van archeologisch en bioarcheologisch onderzoek hier een uniek licht op de leefomstandigheden, ruimtelijke organisatie, zorgpraktijken, omgang met dood, en de maatschappelijke positie van leprozen – doorheen vier eeuwen geschiedenis.

II. Achtergrond kerkhof Sint-Niklaasparochie in Ieper (1200-1600)

In de middeleeuwse stad Ieper bevond zich, op de westelijke oever van de Ieperlee, de Sint-Niklaasparochie. Dit was een van de belangrijkste uitbreidingen van de stad in de 13de eeuw. Deze wijk, vandaag gekend als ‘De Meersen’, ontwikkelde zich in het kader van de snelle demografische en economische groei van Ieper in de volle middeleeuwen. Ieper kende op dat moment een indrukwekkende bloei dankzij de lakennijverheid, en groeide uit tot een van de voornaamste steden van het graafschap Vlaanderen (De Groote & Ervynck, 2022).

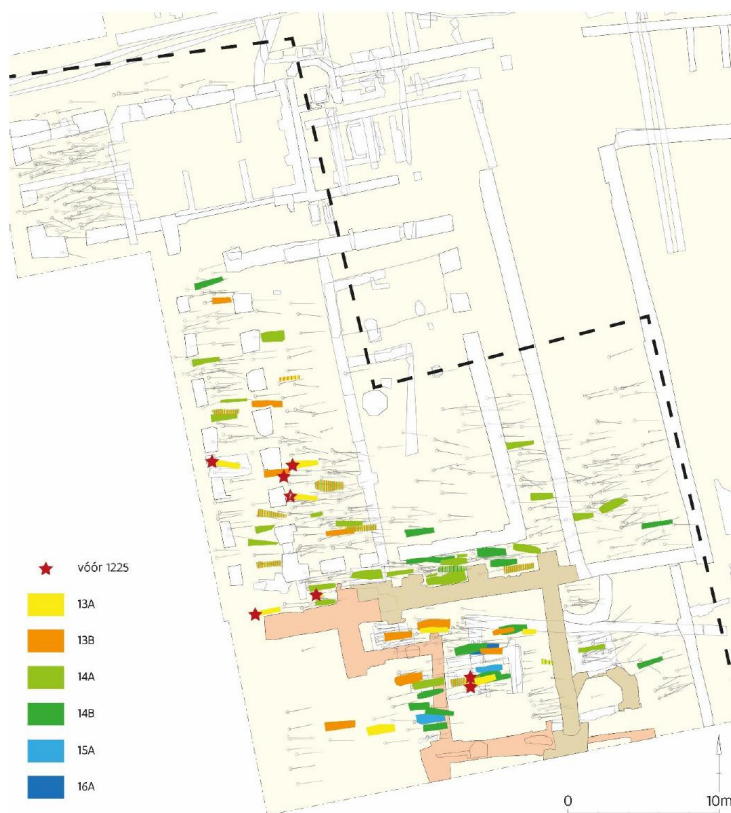


Illustratie 21 De Sint-Niklaaskerk en omgeving zoals afgebeeld op het stadsplan van Ieper uit 1564, geschilderd door Jean Thévelin. © Yper museum.

De Sint-Niklaaskerk zou oorspronkelijk zijn opgericht rond 1180, maar de Sint-Niklaasparochie is te situeren tussen 1200 en 1220 (Illustratie 21). De oudste schriftelijke vermelding van de parochie dateert van 1220, terwijl ze nog ontbreekt in het pauselijke privilege van paus Innocentius III uit 1200. Vermoed wordt dat de parochieontwikkeling verband hield met een schenking van een marktvrij domein door graaf Diederik van de Elzas aan de Tempeliers. De keuze voor Sint-Niklaas als patroonheilige – bijzonder populair onder kooplieden – wijst op een nauwe band met de groeiende handelsgemeenschap ten westen van de rivier de Ieperlee (De Groote & Erynck, 2022).

Rondom de Sint-Niklaaskerk ontwikkelde zich een uitgestrekt parochiekerkhof, gekend als het 'Noorderkerkhof' (Illustratie 22). Dit kerkhof bleef in gebruik tot de stichting van een benedictijnenabdij op dezelfde

locatie in 1598. De abdijgebouwen werden gedeeltelijk bovenop de oude begraafzone opgericht. Bij de archeologische opgravingen werd een aanzienlijk deel van dit kerkhof blootgelegd, met in totaal 1075 geregistreerde skeletten, waarvan 134 in de kerk zelf en 941 op het omliggende kerkhof. Het geslacht was nagenoeg gelijk verdeeld over mannen en vrouwen; ook alle leeftijdsgroepen waren vertegenwoordigd, zoals verwacht bij een parochiale begraafplaats (De Groote & Ervynck, 2022).



Illustratie 22 Situering van alle gedateerde kisten in het grafveld (kleurencode van de graven per halve eeuw; sterretje: de graven die voor 1225 kunnen worden gedateerd; lichtoranje: oudste kerk; beige: uitgebreide hallenkerk; stippellijn: grens van het Noorderkerkhof). © agentschap Onroerend Erfgoed en afbeelding in De Groote & Ervynck (2022).

De datering van de skeletten valt tussen 1200 en 1598, met belangrijke informatie uit de dendrochronologie van de houten grafkisten. De dataset werd opgesplitst in twee periodes: periode 1 (1200-1350) en periode 2 (1350-1598). De eerste periode vangt aan met de oprichting van de parochie, en eindigt met een scherpe daling in het gebruik van grafkisten van import-

eikenhout rond 1350 (Haneca and De Groote, 2024). Dit valt samen met de economische en demografische terugval in Ieper, onder andere door veronderstelde pestgolven en militaire conflicten zoals het beleg van 1383. De tweede periode loopt tot aan de oprichting van de abdij, waarbij het Noorderkerkhof definitief werd verlaten. Het aantal skeletten was evenredig verdeeld over deze twee perioden (De Groote and Ervynck, 2022).



Illustratie 23 De opgravingsite 'De Meersen' in de schaduw van de huidige (gereconstrueerde) Sint-Niklaaskerk. © agentschap Onroerend Erfgoed.

Het projectgebied 'De Meersen', waar de opgravingen plaatsvonden, ligt in de huidige binnenstad van Ieper, tussen de Sint-Janstraat, de Lange Meersstraat, de G. de Stuersstraat en de Sint-Niklaasstraat. De huidige Sint-Niklaaskerk — een reconstructie na de Eerste Wereldoorlog — bevindt zich op de hoek van het terrein (Illustratie 23). De archeologische resultaten bieden een uitzonderlijk venster op het ontstaan, het gebruik en de transformatie van een middeleeuwse stadsparochie en haar begraafplaats,

binnen de bredere context van stedelijke evolutie en religieuze infrastructuur.

III. Methode genetische analyse leperse sites

a) Staalname

Specifiek voor het project *Besiecht ende Besmet* werden skeletten uit beide leperse sites geselecteerd. Van 70 skeletten uit het kerkhof van Hooge Siecken werden tanden verzameld voor genetische analyse. Deze selectie gebeurde in nauw overleg met archeologe dr. Sofie Vanhoutte (Agentschap Onroerend Erfgoed) en fysisch antropologe April Pypelinck. Voor de Sint-Niklaasparochie werden tanden bemonsterd uit 53 skeletten. Ook hier gebeurde de selectie in overleg, met historicus prof. dr. Bart Lambert (VUB), promotor van het project “*The make-up of the city*” over het kerkhof van de Sint-Niklaasparochie. Van de 53 individuen werden er 50 *ad random* gekozen uit de eerste fase van het kerkhof (1200–1350), om een goede vergelijking te maken met de populatie van Hooge Siecken. Daarnaast werd één individu opgenomen dat binnen “*The make-up of the city*” als mogelijk interseksueel werd aangeduid (gedateerd in de 15de of 16de eeuw op basis van ¹⁴C-datering) en twee individuen uit het oudste gedeelte van het kerkhof die beiden een extra snijtand vertoonden en daardoor mogelijk nauw verwant waren. Om die reden zijn er uiteindelijk drie skeletten meer bemonsterd uit de Sint-Niklaasparochie dan oorspronkelijk voorzien. De toevoeging van deze drie individuen — op basis van bijzondere antropologische kenmerken — verrijkt beide onderzoeken en stimuleert interdisciplinaire samenwerking, volledig in de geest van een syntheseproject.

In tegenstelling tot de eerdere sites in Koksijde en Sint-Truiden werd de staalname uitgevoerd binnen *Besiecht ende Besmet*, vandaar de nodige uitleg over onze bemonsteringswijze. Alle tanden werden overgebracht naar het oudDNA-laboratorium van het Laboratorium voor Menselijke Genetische Genealogie aan de KU Leuven. Dit oudDNA-laboratorium is een gespecialiseerde ‘clean room’, een volledig steriel laboratorium dat specifiek is ontworpen voor de verwerking van oudDNA. Het is fysiek gescheiden van

andere laboratoria en wordt door middel van strikte procedures vrijgehouden van contaminatie met modern DNA. Dit gebeurt onder meer door een combinatie van steriele beschermende kleding, een systeem van positieve luchtdruk dat eventuele contaminanten continu naar buiten afvoert, en de toepassing van decontaminatiemiddelen, zoals DNA ExitusPlus™ (Applichem GmbH).

De tandwortels werden gedecontamineerd door ze 5 minuten onder te dompelen in bleekmiddel (6% w/v NaOCl), gevolgd door 2 minuten in ethanol (70% w/v), telkens met drie spoelingen met Millipore-water tussenin. Daarna werden de tanden minstens twee uur blootgesteld aan ultraviolet (UV) licht onder een afzuigkap om te drogen.

b) DNA extraction & sequencing

Voor de DNA-extractie werden individuele extractiebuisjes klaargemaakt met 0,5 µL proteinase K en 20 µL 0,5 M EDTA (pH 8.0) per 1 mg tandweefsel. De tanden werden overgebracht naar de buisjes om lysis te bevorderen en om het vrijgekomen DNA te beschermen tegen verdere degradatie. De stalen werden gedurende 72 uur op kamertemperatuur geïncubeerd op een schommelplaat.

Vervolgens werd het DNA opgezuiverd uit de opgeloste tandmatrix en werden dubbelstrengige sequencing *libraries* aangemaakt, gebruikmakend van Illumina-specifieke adapters met dubbele indexering. Deze libraries werden vermenigvuldigd via PCR (*polymerase chain reaction*) en vervolgens gesequenced met paired-end reads (50 baseparen) op het Illumina NovaSeq XPlus-platform aan het Functional Genomics Center Zürich en de Genomics Core van de KU Leuven.

c) Verwerking van oudDNA-sequencing data

De ruwe FASTQ-reads werden verkregen van de genomische centra. Voor de alignering werd eerst een kwaliteitscontrole uitgevoerd met FastQC (v0.12.1) (Simon, 2015), samengebracht met MultiQC (v1.20) (Ewels *et al.*, 2016).

Adapters, indexen en *poly-G-tails* werden verwijderd van de sequentie-einden met Cutadapt (v2.1) (Martin, 2011), bij een maximale foutmarge van 20% en een minimale readlengte van 28. Cutadapt werd ook gebruikt om basen met een kwaliteit lager dan 20 en omliggende 'N'-basen te verwijderen via de --trim-n optie.

De forward en reverse reads werden samengevoegd met FLASH (v1.2.11) (Magoč and Salzberg, 2011), waarbij de maximale overlaplengte werd ingesteld op 125 baseparen. De samengevoegde FASTQ-reads werden vervolgens gealigneerd op het menselijke referentiegenoom hs37d5 (van het 1000 Genomes Project) met de Burrows-Wheeler Aligner (BWA v0.7.17) (Li and Durbin, 2009).

Vervolgens werden de aligneringen gesorteerd, geconverteerd naar BAM-formaat en geïndexeerd met SAMtools (v1.9) (Li *et al.*, 2009). Niet-gemapte reads werden gefilterd met SAMtools -F4. Daarna werden dubbele reads gemarkeerd en verwijderd met de MarkDuplicates-functie van Picard (v2.18.23), ingesteld op REMOVE_DUPLICATES=true en met een lage validatienauwkeurigheid (Broad Institute, 2015).

Insertie/deletie-regio's – ook wel indels genoemd – werden opnieuw gealigneerd met de tools RealignerTargetCreator en IndelRealigner van het Genome Analysis Toolkit (GATK v3.5) (Auwera and O'Connor, 2020). Reads met een mapping-kwaliteit lager dan tien (Phred-scale) werden gefilterd met SAMtools (v1.9) (Li *et al.*, 2009). Tot slot werden samenvattende statistieken gegenereerd over het aantal reads, dekkingsdiepte en mapping-kwaliteit met SAMtools stats (v1.19) (Li *et al.*, 2009).

Het aandeel endogeen DNA werd berekend als het aantal gemapte reads op het menselijke genoom (inclusief duplicaten) gedeeld door het totale aantal reads dat werd gesequenced. De complexiteit van de library werd bepaald door het aantal uniek gemapte reads te delen door het totaal aantal gemapte reads (inclusief duplicaten).

d) Authenticatie en contaminatie-inschatting van oudDNA

Om de kwaliteit van het oudDNA te verifiëren, werden typische postmortale schade patronen geëvalueerd met *mapDamage* (v2.2.2) (Ginolhac *et al.*, 2011). Deze software kwantificeert onder andere cytosinedeaminatie aan de uiteinden van de reads — een typisch kenmerk van oudDNA.

De nucleaire contaminatie bij genetisch mannelijke individuen werd ingeschat via het X-chromosoom met behulp van *ANGSD* (v0.917) (Korneliussen, Albrechtsen and Nielsen, 2014). Aangezien mannen slechts één X-chromosoom hebben, wijst de aanwezigheid van heterozygote posities op mogelijke contaminatie. De contaminatiegraad werd ingeschat met twee methodes via het *contamination.R*-script.

Mitochondriale contaminatie werd geëvalueerd met *contamMix* (v1.0.11) (Fu *et al.*, 2013). Mitochondriale reads werden eerst geëxtraheerd uit de BAM-bestanden met *SAMtools* (v1.18) (Li *et al.*, 2009), vervolgens geconverteerd naar VCF-formaat met *BCFtools* (v1.18) (Danecek *et al.*, 2011). Op basis van posities met een dekking van minstens 5x werd een consensussequentie opgebouwd. Deze werd samengevoegd met een referentiepanel van 311 menselijke mitochondriale genomen voor multiple sequence alignment via *mafft* (v7.427) (Katoh *et al.*, 2002).

De consensus werd vervolgens geïndexeerd met *BWA* (v0.7.17) (Li and Durbin, 2009) en *SAMtools* (Li *et al.*, 2009), en een sequentie-woordenboek (sequence dictionary) werd gegenereerd met het *CreateSequenceDictionary*-hulpmiddel van *Picard* (v2.18.23) (Broad Institute, 2015). De reads werden daarna omgezet naar FASTQ-formaat via *SamToFastq* (Picard), en opnieuw gealigneerd op de consensussequentie. Duplicaten werden verwijderd via *MarkDuplicates*, en indels werden heraligneerd met GATK (Broad Institute, 2015; Auwera and O'Connor, 2020). Tot slot werd de contaminatiegraad bepaald met het *estimate.R*-script van *contamMix*, gebaseerd op de realignments en het referentiepanel van 311 mtDNA-sequenties (Fu *et al.*, 2013). Hierbij werd de optie *trimBases* toegepast om zeven basen van elk uiteinde van de reads te verwijderen.

e) Genetische geslachtsbepaling

Het genetisch geslacht van de individuen werd bepaald met behulp van *Karyo_RxRy* (v1.0.1), na filtering van de alignments op een mappingkwaliteit van minstens 20 via *SAMtools* (v1.18) (Anastasiadou *et al.*, 2024). Deze methode maakt gebruik van de verhouding tussen de X- en Y-chromosomale reads om het geslacht te bepalen. Naast de klassieke binaire bepaling (man/vrouw), kan deze tool ook afwijkende karyotypes detecteren, zoals het syndroom van Turner (een enkel X en geen tweede geslachtschromosoom), Klinefelter (XXY en dus drie geslachtschromosomen), en Down of trisomie 21 (via de --chr21-optie).

f) Uniparentale haplogroepen

Mitochondriale haplogroepen

Om mitochondriale DNA-haplogroepen te bepalen, werden de reads die op het mitochondriale genoom aligneren geëxtraheerd met *SAMtools* (v1.18) en omgezet naar VCF-formaat via *BCFtools* (v1.19) (Li *et al.*, 2009; Danecek *et al.*, 2011). Deze bestanden werden ingevoerd in *Haplogrep* (v3.2.1), dat haplogroepen toewijst op basis van de mtDNA-stamboom van *PhyloTree* (versie 17 – Forensic Update 1.2), en met behulp van de Kulczynski-afstand (Schönherr *et al.*, 2023).

Y-chromosomale haplogroepen

Voor de bepaling van Y-haplogroepen werden SNPs op het Y-chromosoom geïdentificeerd met *ANGSD* (v0.917), via de parameters -doHaploCall, -doCounts, en -sites (waarbij een positie-bestand met 273.059 Y-SNPs werd gebruikt) (Korneliussen, Albrechtsen and Nielsen, 2014). De output werd geconverteerd naar PLINK-formaat met *HaploToPlink* en vervolgens naar VCF- en BED-formaat met *PLINK* (v1.9) (Purcell *et al.*, 2007). SNPs met niet-conventionele varianten (anders dan referentie of alternatief) werden verwijderd.

De data werden omgezet naar haploïde formaat. Voor de haplogroepbepaling werd *bedtools* (v2.29.2) (Quinlan and Hall, 2010) gebruikt om de SNPs te kruisen met referentie-BED-bestanden voor bekende haplogroepen. Hierbij werd eerst een globale toewijzing gemaakt aan een hoofdhaplogroep, waarna verdere verfijning gebeurde met subhaplogroepen. De *YFull*-stamboom werd gebruikt om de SNPs te linken aan hun haplogroepen (<http://yfull.com/tree/>). Een minimum van twee haplogroep-definiërende markers was vereist om een haplogroep toe te wijzen.

g) Pseudohaploïde genotypering

Om vertekening door lage sequentiedekking en typische beschadigingen te vermijden, werd pseudohaploïde genotypering toegepast. Hierbij wordt per genetische locus één enkel hoogkwalitatief allel willekeurig gekozen uit het diploïde genotype. Hiervoor werd de *SequenceTools* repository (v1.5.4.0) gevolgd (<https://github.com/stschiff/sequenceTools>). Eerst werd een *pileup*-bestand gegenereerd met *SAMtools* (v1.21) voor alle individuen met een dekking van meer dan 0.05x. Enkel posities met een minimale mapping- en basekwaliteit van 30 werden behouden. De *pileup*-data werd beperkt tot posities uit de 1240K SNP-set van het Allen Ancient DNA Resource (AADR), en gealigneerd op het hs37d5-referentiegenoom (Mallick *et al.*, 2024).

De stalen werden vervolgens pseudohaploïd gemaakt met het *pileupCaller*-script, gebruikmakend van de `--randomHaploid` optie. Het resultaat werd opgeslagen in EIGENSTRAT-formaat, geschikt voor verdere populatiegenetische analyses.

h) Detectie van verwantschappen (1ste tot 3de graad) met KIN en READ

Om nauwe biologische verwantschappen (tot de derde graad) op te sporen, werden twee complementaire tools gebruikt: *KIN* (v0.1.0) (Popli, Peyrégne and Peter, 2023) en *READv2* (v2.1.1) (Alaçamlı *et al.*, 2024). Analyse was beperkt tot individuen met een minimale dekking van 0.05x, wat resulteerde in 37 individuen uit de Sint-Niklaasparochie en 39 uit Sint-Jan.

KIN detecteert verwantschap door ‘identity-by-descent’-segmenten (IBD) tussen individuen op te sporen. De input werd voorbereid met *KINgaroo*, waarbij de parameters -cnt en -s beiden op 0 werden ingesteld. Ter verificatie werd ook *READ* uitgevoerd, dat verwantschap inschat op basis van pairwise mismatch rates in pseudohaploïde data. Hiervoor werd het EIGENSTRAT-formaat geconverteerd naar PLINK-formaat via het *convertf*-script uit *EIGENSOFT* (v8.0.0) (Patterson, Price and Reich, 2006). *READ* werd uitgevoerd met de standaard normalisatiemethode.

i) Runs of Homozygosity (ROH)-analyse

Om de ouderlijke verwantschap onder de middeleeuwse individuen uit Ieper te evalueren, werd gezocht naar *runs of homozygosity* (ROH) met behulp van *hapROH* (v0.64) (Ringbauer, Novembre and Steinrücken, 2021). Deze analyse werd uitgevoerd op pseudohaploïde data in EIGENSTRAT-formaat, beperkt tot individuen bij wie minstens 400.000 van de 1240K SNPs gedekt waren (n = 31).

ROH zijn DNA-segmenten waarin beide chromosomen identiek zijn — het gevolg van het erven van gelijke haplotypes van beide ouders. De aanwezigheid van langere of meer frequente ROH wijst op nauwere verwantschap tussen de ouders.

j) Imputatie

Door postmortale schade is het accuraat oproepen van genotypen in oudDNA moeilijk, wat de betrouwbaarheid van autosomale analyses kan beperken. Om dit te compenseren werd *imputatie* toegepast, waarbij ontbrekende genetische varianten statistisch worden ingevuld op basis van patronen in moderne referentiepanels.

Voor de stalen met een minimale dekking van 0.1x werd *QUILT* gebruikt om ontbrekende varianten in te vullen (Davies *et al.*, 2021). Dit leverde 32 geïmputeerde genomen op voor Sint-Jan en 26 voor de Sint-Niklaasparochie. Na imputatie werden de overlappende genoomvensters samengevoegd met de *concat*-functie van *bcftools* (v1.15.1) (Danecek *et al.*, 2011).

Conflicterende genotypen werden gecorrigeerd met de `--gp-to-gt` optie van `+tag2tag`.

SNP-varianten met een *minor allele frequency* (MAF) onder 5% in het *HRC* referentiepanel werden verwijderd, omdat de imputatienauwkeurigheid bij zulke zeldzame varianten laag ligt (McCarthy *et al.*, 2016). Uiteindelijk bleven ongeveer 6 miljoen varianten over voor verdere analyses.

k) Principaal Component Analyse (PCA)

De 58 geïmputeerde stalen uit leper werden samengevoegd met een referentiedataset van 3006 individuen afkomstig uit de (late) ijzertijd (LIA/IA), Romeinse periode, vroege en volle middeleeuwen (EMA/HMA) (Fischer *et al.*, 2022; Gretzinger *et al.*, 2022; Sasso *et al.*, 2024; Scheib *et al.*, 2024; Beneker *et al.*, 2025), en moderne Europese populaties (UK Biobank (Sudlow *et al.*, 2015) en MinE-consortium (Project MinE ALS Sequencing Consortium, 2018)). De samensmelting gebeurde met behulp van *PLINK* v1.9 en de optie `--bmerge` (Purcell *et al.*, 2007). De samengevoegde dataset omvatte 3064 individuen met 238.449 genetische varianten.

Na het verwijderen van varianten in *linkage disequilibrium* met de optie `--indep-pairwise 1000 50 0.5`, bleven er 149.121 varianten over. Verwante individuen werden verwijderd met behulp van de `--genome` en `--remove` functies (Purcell *et al.*, 2007), wat resulteerde in een finale dataset van 3026 individuen.

De eerste vier hoofdcomponenten werden berekend met *FlashPCA2* v2.1 zonder projectie (Abraham, Qiu and Inouye, 2017). Hoofdcomponent 1 en 2 werden gevisualiseerd met behulp van *Plotly* v4.10.4 in *R* v4.4.2 (Plotly Technologies Inc, 2015).

Tabel 1 Referentiepopulaties gebruikt voor de principaal component analyse.

Populatie	Tijdperk	# Individuen	Bron
België	EMA/HMA	373	Sasso <i>et al.</i> 2024

Populatie	Tijdperk	# Individuen	Bron
Denemarken	Modern	78	MinE consortium
	EMA	7	Gretzinger <i>et al.</i> 2022
	VIK	72	
Frankrijk	Modern	175	UK Biobank
	LIA	18	Fischer <i>et al.</i> 2022
	Modern	191	UK Biobank
Duitsland	LA	2	Gretzinger <i>et al.</i> 2022
	EMA	26	
	HMA	11	
Ierland	EMA	21	
	Modern	200	UK Biobank
Nederland	EMA	21	
	Modern	195	MinE consortium / UK Biobank
Noorwegen	VIK	25	
	Modern	81	UK Biobank
Spanje	Modern	190	UK Biobank
Zweden	Modern	187	UK Biobank
Verenigd Koninkrijk	IA, ROM, EMA, VIK, Modern	1061	Gretzinger <i>et al.</i> 2022 / UK Biobank

Legende: IA = ijzertijd, LIA = late ijzertijd, ROM = Romeinse tijd, LA = late oudheid, EMA = vroege middeleeuwen, VIK = Vikingtijd, HMA = volle middeleeuwen.

l) f-statistieken

Outgroup f_3 - en f_4 -statistieken werden berekend op basis van de geïmputeerde genotypes in PLINK-formaat met behulp van *ADMIXTOOLS* v2.0.8 (Maier *et al.*, 2023). De inputdataset omvatte 58 geïmputeerde genomen uit Ieper, gecombineerd met 1517 individuen afkomstig uit de (late) ijzertijd (LIA/IA), Romeinse periode, vroege en volle middeleeuwen (EMA/HMA) en moderne West-Europese populaties, evenals 108 individuen van de Afrikaanse Yoruba-populatie (YRI).

De dataset werd teruggebracht tot 641.221 SNPs die aanwezig zijn in de *Allen Ancient DNA Resource* (AADR). Drie outliers uit de late ijzertijd in Frankrijk (Fischer *et al.*, 2022) (UN19, UN85, UN129) en één outlier uit het vroegmiddeleeuwse Ierland (KIL042) (Gretzinger *et al.*, 2022) werden verwijderd, wat resulteerde in een einddataset van 1679 individuen.

Eerst werden f_2 -statistieken berekend, die de basis vormen voor alle latere f -statistieken. De f_2 -waarden werden berekend tussen de Ieperse genomen en alle referentiepopulaties met behulp van de `extract_f2`-functie in *ADMIXTOOLS2* (Maier *et al.*, 2023).

Daarna werden outgroup f_3 -statistieken berekend in de vorm van:

$f_3(\text{Outgroup; Testpopulatie; Target})$

→ waarbij *Yoruba* diende als outgroup, de referentiepopulaties uit het verleden als testpopulaties, en de individuen uit Sint-Niklaas en Sint-Jan als targets.

De f_4 -statistieken werden berekend in de vorm van:

$f_4(\text{Testpopulatie1, Testpopulatie2; Target, Outgroup})$

→ om de correlatie te meten tussen alle frequentieverschillen tussen referentiepopulaties enerzijds en het verschil tussen het target en de outgroup anderzijds.

Voor deze f_4 -statistieken werden dezelfde target- en outgroup-populaties gebruikt als voor de f_3 -berekeningen.

De resultaten werden gevisualiseerd met de pakketten *tidyverse* v2.0.0, *reshape2* v1.4.4 en *ggplot2* v3.5.1 in *R* v4.4.2 (Wickham, 2007; 2016; Wickham *et al.*, 2019).

Tabel 2 Referentiepopulaties gebruikt voor f_3 - en f_4 -statistieken.

Populatie	Tijdperk	# Individuen	Bron
België – Sint-Truiden	EMA/HMA/LMA	327	Beneker <i>et al.</i> 2025
België – Koksijde	EMA	20	Sasso <i>et al.</i> 2024
België – Wulpen	HMA/LMA	5	Sasso <i>et al.</i> 2024
Ierland (ST-individuen)	EMA/HMA/LMA	5	Beneker <i>et al.</i> 2025
Denemarken	EMA / VIK	7 / 73	Gretzinger <i>et al.</i> 2022
Frankrijk	LIA	15	Fischer <i>et al.</i> 2022
Duitsland	EMA / HMA	33 / 11	Gretzinger <i>et al.</i> 2022
Ierland	EMA	20	Gretzinger <i>et al.</i> 2022
Nederland	EMA	22	Gretzinger <i>et al.</i> 2022
Noorwegen	VIK	28	
VK	ROM / EMA / VIK	46 / 152 / 33	Gretzinger <i>et al.</i> 2022
Yoruba	Modern	108	1000 Genomes Project

Legende: IA = ijzertijd, LIA = late ijzertijd, ROM = Romeinse tijd, LA = late oudheid, EMA = vroege middeleeuwen, VIK = Vikingtijd, HMA = volle middeleeuwen.

m) Detectie van verre verwantschap (>3de graad) met IBIS

Verwantschappen tot en met de zesde graad werden geanalyseerd met behulp van *IBIS* v1.20.9 (Seidman *et al.*, 2020), een tool die verre verwantschappen opspoort door segmenten van identieke oorsprong (*identity by descent*, IBD) te detecteren op basis van gedeelde allelen (*identity by state*, IBS).

IBIS is speciaal ontworpen voor ongefaseerde genotypegegevens en maakt gebruik van geïmputeerde PLINK-bestanden als input. Voor deze analyse werden de PLINK-bestanden gebruikt van:

- 58 geïmputeerde individuen uit Ieper,
- 332 middeleeuwse individuen uit Sint-Truiden,
- 20 vroegmiddeleeuwse individuen uit Koksijde,
- 5 volle middeleeuwse individuen uit Wulpen, geanalyseerd in Sasso *et al.* (2024).

Zo kon de genetische verwantschap tussen Ieper en andere middeleeuwse populaties uit Vlaanderen worden vergeleken.

Voorafgaand aan de IBIS-analyse werd de *HapMap II human genetic map* toegevoegd aan het .bim-bestand via het *add-map-plink.pl*-script van IBIS (geleverd bij de tool).

Daarna werd IBIS uitgevoerd met volgende instellingen:

- Minimumlengte van gedeeld segment: **7 centiMorgan (cM)**
- Minimaal aantal gedeelde markers: **436**
- Parameter **-a** ingesteld op 0.00138
- Foutmarge: **0.004 fouten per merker.**

IV. Resultaten genetische analyse Ieperse sites

a) Kwaliteitscontrole van het genetisch materiaal

Genetische data werden gegenereerd voor de 70 stalen afkomstig van de site Hooge Siecken en 53 stalen van de Sint-Niklaasparochie in Ieper. De eerste kwaliteitscontrole met behulp van FastQC-rapporten wees op een over het algemeen goede datakwaliteit, zonder grote afwijkingen. De enige opmerkelijke vaststelling was een licht verhoogd GC-gehalte, wat niet ongebruikelijk is bij oudDNA-stalen, voornamelijk door de aanwezigheid van bacterieel DNA.

De gemiddelde autosomale sequentiedekking over alle stalen bedroeg 0,2431x, met een minimum van 0,000007x en een maximum van 1,29x. Hoewel de site Hooge Siecken iets meer stalen bevatte met zowel extreem lage als hoge dekking vergeleken met Sint-Niklaas, waren de algemene verdelingen van sequentiedekking tussen beide sites vergelijkbaar. Dit suggereert een gelijkaardig bewaringsniveau van het DNA-materiaal. De meerderheid van de stalen (n = 76) had voldoende genomische dekking ($\geq 0,05x$) om opgenomen te worden in de verdere analyses. In totaal hadden 47 individuen een dekking onder deze drempel en werden daarom uitgesloten van de meeste analyses. Stalen met een dekking boven 0,01x (n = 82) werden wel behouden voor geslachtsbepaling, en die met een mitochondriale dekking boven 10x (n = 83) werden opgenomen in de mtDNA-analyse.

Tabel 3 Sequentiedekking van de gesequeneerde genomen geanalyseerd in dit project.

ARCHEOLOGISCHE SITE	AANTAL INDIVIDUEN	$\geq 0.05x$ DEKKING	IMPUTATIE ($\geq 0.01x$)
DE MEERSEN (SINT-NIKLAAS, IEPER)	53	37	26
HOOGE SIECKEN (SINT-JAN, IEPER)	70	39	32

Het aandeel endogeen DNA varieerde bij de meeste stalen van 1,62% tot 79,32%. In 33 stalen werd echter een opvallend laag aandeel vastgesteld, tussen 0,07% en 1,5%. Deze stalen hadden daardoor een extreem lage dekking ($< 0,002x$) en werden uitgesloten van verdere analyses. De bibliotheekcomplexiteit, gemeten als het aandeel uniek gemapte reads, varieerde van 14,72% tot 85,09%.

Ter verificatie van de aanwezigheid van authentiek oudDNA werd het patroon van cytosinedeaminatie geëvalueerd — een kenmerkende vorm van postmortale DNA-schade. De analyse toonde cytosine-naar-thymine-substitutiepercentages van 6% tot 34% over alle stalen, met een gemiddelde

van 19,31%, wat in overeenstemming is met middeleeuwse oudDNA-studies.

Contaminatie werd geëvalueerd op basis van het mitochondriale DNA bij alle individuen en op basis van het nucleaire DNA bij mannelijke individuen. De mitochondriale contaminatie lag bij alle stalen onder de 5%. De nucleaire contaminatie bij de mannelijke individuen bleef bij de meeste individuen onder de 5%. Een kleine groep — drie van Sint-Niklaas en vijf van Sint-Jan — vertoonde waarden tussen 5% en 10%. Aangezien hun mitochondriale contaminatie laag bleef (maximaal 2,6%) en deze meting betrouwbaarder is wegens de hoge kopijgetallen van mtDNA, werd beslist deze individuen toch te behouden voor verdere analyses, zij het met de nodige voorzichtigheid bij de interpretatie.

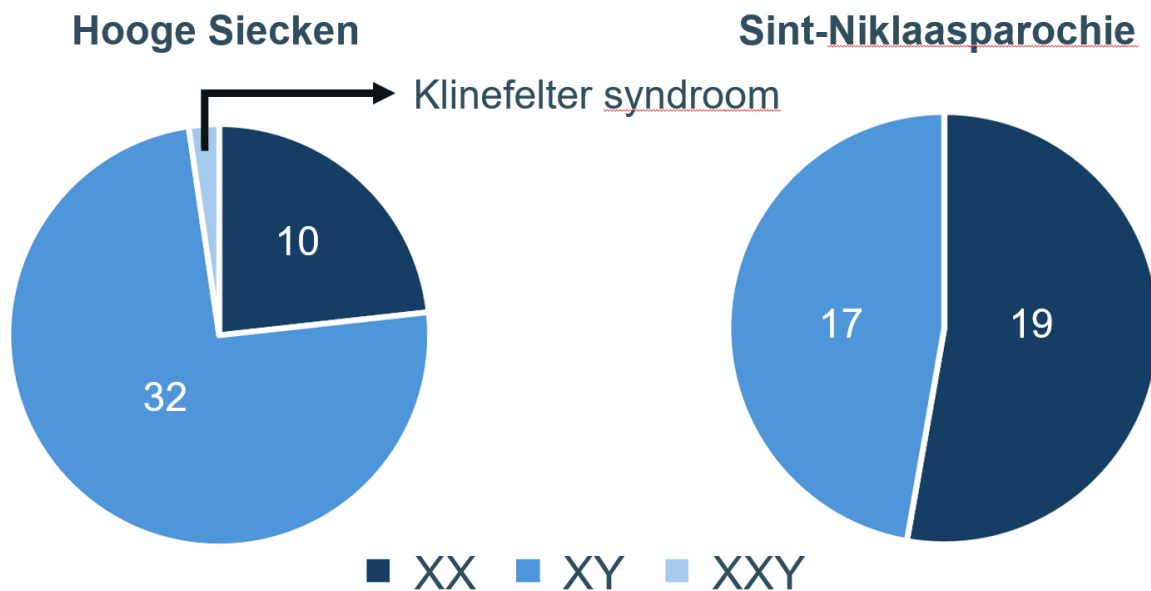
b) Genetische geslachtsbepaling

Het genetisch geslacht werd bepaald voor alle individuen uit Ieper. Volgens Anastasiadou K. *et al.* kan de tool *karyo_RxRy* het genetisch geslacht al betrouwbaar schatten vanaf een sequentiedekking van slechts 0,0001x. In deze studie werd echter vastgesteld dat verscheidene stalen boven deze drempel toch onduidelijke of foutieve resultaten opleverden, zoals vermoedelijke vals-positieve XYY-classificaties. Daarom werd in deze studie beslist om de geslachtsbepaling te beperken tot individuen met minstens 500.000 reads die op de autosomen mappen — wat overeenkomt met een dekking van ongeveer 0,01x — om de betrouwbaarheid te verhogen.

De genetische geslachtsbepaling werd vergeleken met het geslacht bepaald op basis van osteologische (skelet-)analyse. Afwijkingen tussen beide methoden werden vooral vastgesteld bij stalen met een sequentiedekking onder 0,01x; deze verschillen zijn dus vermoedelijk te wijten aan de beperkte kwaliteit van de genetische data. In sommige gevallen, waarin het osteologisch geslacht niet kon worden vastgesteld of twijfelachtig was, bood het genetisch onderzoek met voldoende dekking wél een duidelijk antwoord. Omgekeerd bleken sommige individuen met hoge sequentiedekking — en dus betrouwbare genetische geslachtsbepaling — niet overeen te stemmen met de osteologische inschatting, wat ook wijst op de beperkingen van

skeletanalyse. Deze bevindingen onderstrepen het belang van een complementaire benadering waarbij osteologische en genetische gegevens samen worden geïnterpreteerd.

Onder de individuen met voldoende dekking werden in Sint-Jan 32 mannen en tien vrouwen geïdentificeerd, terwijl in de Sint-Niklaasparochie 17 mannen en 19 vrouwen werden vastgesteld (Illustratie 24). Dit wijst op een hogere man-vrouwverhouding in Hooge Siecken ($p = 0,01$, Fisher's exact test), terwijl de verhouding in Sint-Niklaasparochie nagenoeg gelijk was.



Illustratie 24 Overzicht van de verhouding genetische geslachten onder de populaties van Hooge Siecken en de Sint-Niklaasparochie.

Opvallend was dat bij individu 53 (S914) uit Hooge Siecken, dat over voldoende genetische dekking beschikte, een XXY-karyotype werd vastgesteld. Dit wijst op het syndroom van Klinefelter, een aangeboren chromosomale aandoening waarbij een man een extra X-chromosoom bezit. Het syndroom van Klinefelter wordt gekenmerkt door een tekort aan testosteron en verminderde vruchtbaarheid, een verhoogd risico op

osteoporose, atypische lichaamsverhoudingen, soms ook verminderde sociale en motorische vaardigheden, en tandheelkundige afwijkingen. Opmerkelijk is dat ook in het osteologisch rapport van individu 53 (S914) – opgesteld door fysisch antropologe April Pijpelink – kenmerken terugkwamen die met het syndroom overeenstemmen. Zo werd het individu omschreven als groter dan gemiddeld, met een compressiefractuur die mogelijk het gevolg was van osteoporose. Daarnaast werden ook ontbrekende premolaren en sporen van lepra vastgesteld. Deze combinatie van genetische en osteologische vaststellingen onderstreept de meerwaarde van genetische methoden ten opzichte van skeletanalyse alleen al bij het detecteren van geslachtschromosoomafwijkingen zoals Klinefelter.

Seksbevestiging van individu SK1739

Op basis van osteologische analyse van de skeletresten toegeschreven aan individu SK1739 van de Sint-Niklaasparochie ontstond de hypothese van interseksualiteit in het project “*The make-up of the city*”, onder leiding van Prof. dr. Bart Lambert. Een formele methode om deze hypothese te onderzoeken, is het analyseren van *shotgun sequencing* van oud DNA, waarmee afwijkende aantallen geslachtschromosomen opgespoord kunnen worden, zoals die voorkomen bij bepaalde interseksecondities, bijvoorbeeld het syndroom van Turner (X0) en Klinefelter (XXY). Door de ratio (R_y) te berekenen van het aantal DNA-reads dat exclusief op het Y-chromosoom uitlijnt ten opzichte van de reads die op zowel het X- als Y-chromosoom uitlijnen, kan het chromosomale geslacht van een individu worden bepaald. Skoglund *et al.* (2013) formuleerden empirische criteria voor deze R_y -waarde: een mannelijk karyotype (XY) wordt toegekend als de ondergrens van het betrouwbaarheidsinterval (BI) van R_y groter is dan 0,077, en een vrouwelijk karyotype (XX) als de bovengrens van het BI kleiner is dan 0,016. Afwijkingen van deze grenzen kunnen wijzen op interseksecondities (Skoglund *et al.*, 2013).

Voor SK1739 bedraagt de berekende R_y -waarde $0,0015 \pm 0$. Deze valt binnen het betrouwbaarheidsinterval dat overeenkomt met een XX-karyotype (waarbij de bovengrens van het BI lager is dan 0,016), wat wijst op een

genetische vrouw. Bovendien stemt de Ry-waarde van SK1739 volledig overeen met het bereik van waarden dat in ons laboratorium bij genetische vrouwen wordt vastgesteld, terwijl andere stalen soms afwijkende Ry-waarden vertonen waardoor een eenduidige geslachtsbepaling niet mogelijk is.

Daarnaast werd de dekking van alle chromosomen berekend. Hieruit bleek dat de gemiddelde diepte voor de autosomale chromosomen en het X-chromosoom vergelijkbaar was, terwijl de diepte voor het Y-chromosoom duidelijk laag bleef. De beperkte aanwezigheid van Y-chromosomaal DNA sluit interseksecondities met extra Y-chromosomen, zoals Klinefelter, uit. De gelijke dekking van het X-chromosoom en de autosomen sluit op haar beurt syndromen met meer of minder dan twee X-chromosomen, zoals Turner, uit.

Op basis van deze aanvullende analyses wordt individu SK1739 daarom genetisch als vrouw (XX) geclassificeerd.

Het skelet werd voor verdere evaluatie voorgelegd aan het team van klinisch genetici van UZ Leuven onder leiding van Prof. Dr. Geert Mortier. Deze experts stelden vast dat de waargenomen kenmerken niet wijzen op interseksualiteit, maar op een uitgesproken skeletdysmorphie die vermoedelijk het gevolg is van een niet nader te specificeren genetische of aangeboren aandoening.

c) Verwantschapsanalyse

Nauwe genetische verwantschappen

Nauwe genetische verwantschappen werden onderzocht om potentiële verschillen in verwantschapspatronen tussen Hooge Siecken en het kerkhof van de Sint-Niklaasparochie na te gaan. De bepaling van verwantschap is bovendien essentieel om vertekening van herkomstanalyses te vermijden. Twee methoden — KIN en READv2 — werden toegepast om genetische

verwantschap tot de derde graad te detecteren bij 2850 paren van leperse individuen met een dekking van >0,05x.

Deze tools onthulden vier gevallen van nauwe verwantschap (Tabel 4). Binnen de parochie van Sint-Niklaas werden drie verwantschappen in eerste graad vastgesteld: twee ouder-kindparen en één paar van broer-zus. Daarnaast identificeerde READv2 ook twee verwantschappen in derde graad, eveneens in de Sint-Niklaasparochie. Alle nauwe verwantschappen werden binnen de Sint-Niklaasparochie aangetroffen. Er werden geen nauwe genetische banden vastgesteld tussen individuen uit de Hooge Siecken, noch verwantschappen tussen de twee sites. Hoewel dit verschil statistisch niet significant was ($p = 0,11$, Fisher's exact test), strookt het met de verwachtingen op basis van het verschillende sociale karakter van de twee locaties, het leprozeriecomplex Hooge Siecken *versus* de lokale stadsparochie Sint-Niklaas.

Tabel 4 Detectie van nauwe en verre verwantschappen tussen individuen uit leper en andere populaties afkomstig van archeologische sites in huidig Vlaanderen die al onderzocht zijn (Wulpen, Koksijde, Sint-Truiden; hoewel er met de twee laatste sites geen verwantschappen werden gevonden).

IND 1	IND 2	RELATEDNESS				
		READV2	KIN	GRAAD	IBIS	SOM
					# SEGMENTEN >7CM	
						SEGMENTEN >7CM
SN2525	SN2665	1 ^{ste} graad	Ouder-kind	<0.1x	<0.1x	<0.1x
SN3052	SN3242	Ouder-kind	Ouder-kind	1 ^{ste} graad	156	2264.624886
SN3111	SN3186	Broers/zussen	Broers/zussen	2 ^{de} graad	199	2459.559787
SN1836	SN3242	3 ^{de} graad	/	4 ^{de} graad	32	548.578579
SN1939	SN3705	3 ^{de} graad	/	<0.1x	<0.1x	<0.1x
SN3052	SN1836	/	/	5 ^{de} graad	23	306.726697
YP0397	SN2276	/	/	5 ^{de} graad	14	250.787041
YP1643	SN2453	/	/	5 ^{de} graad	10	156.148937
YP1221	YP0327	/	/	6 ^{de} graad	7	118.371163

SN3587	YP0397	/	/	6 ^{de} graad	4	78.350558
SN1970	SN2276	/	/	6 ^{de} graad	5	90.150442
SN3216	YP0481	/	/	7 ^{de} graad	4	67.023555
SN3216	SN2453	/	/	7 ^{de} graad	3	43.50801
YP1611	YP0397	/	/	7 ^{de} graad	2	39.267908
SN4018	YP0376	/	/	7 ^{de} graad	4	52.466947
YP0165	YP1576	/	/	7 ^{de} graad	5	45.882177
SN1836	YP1643	/	/	7 ^{de} graad	3	74.601654
WPK006	SN2441	/	/	7 ^{de} graad	4	41.313949
WPK006	YP0376	/	/	7 ^{de} graad	4	60.14104

Legende: SN = Sint-Niklaasparochie; YP = Hooge Siecken; WPK = Wulpen. <0.1x betekent dat de individuele sequencing dekking te laag was om IBIS uit te voeren.

Verre genetische verwantschappen

Om ook meer verre verwantschappen op te sporen, werd gebruikgemaakt van het programma IBIS, dat werkt op basis van geïmputeerde data. In totaal werden 58 individuen uit Ieper met een dekking >0,1x opgenomen in de analyse, goed voor 1597 paarvergelijkingen. In totaal werden dertien verwantschappen tussen de vierde en zevende graad vastgesteld (zie Tabel 4).

Binnen de begraafplaats van Sint-Niklaas kwamen verre verwantschappen voor tussen de vierde en zevende graad. Opmerkelijk is dat één van de relaties in derde graad, geïdentificeerd via READv2, werd geclassificeerd als vierde graad door IBIS, en het broer-zus-paar als tweede graad — wat duidt op kleine methodologische verschillen en de onmogelijkheid van genetische genealogie om een exacte graad weer te geven door de overlap tussen de graden. Andere relaties die met KIN en READv2 werden vastgesteld, konden door IBIS niet bevestigd worden omwille van te lage dekking (<0.1x) en bijgevolg gebrek aan imputatie.

Ook voor de Hooge Siecken werden enkele verre verwantschappen vastgesteld, gaande van de vijfde tot zevende graad. Opvallend is dat ook tussen de twee sites (Hooge Siecken en Sint-Niklaasparochie) genetische banden werden vastgesteld. Dit ondermijnt eerdere hypothesen voor middeleeuwse leproserieën op basis van voornamelijk die van Barcelona dat veel van hun bewoners vooral van boven-lokale oorsprong zou zijn (Pfrengle *et al.* 2021). Voor het graafschap Vlaanderen zijn de historische bronnen het echter eens: zeker vanaf de 13de eeuw moest men poorter zijn (zie Vanhoutte *et al.* 2021). Voor de Hooge Siecken wijzen de verwantschapsbanden duidelijk op lokale herkomst.

Om te toetsen of zulke verre verwantschappen ook elders in Vlaanderen voorkomen, en dus geen lokaal fenomeen zijn, werd IBIS ook gebruikt op een gecombineerde dataset van 58 leperse individuen en 357 individuen uit Sint-Truiden, Koksijde en Wulpen, goed voor 85.905 paarvergelijkingen. Deze vergelijking leverde slechts twee mogelijke verwantschappen op in zevende graad, beide met dezelfde persoon uit Wulpen (WPK006), die genetische banden vertoonde met één individu uit Hooge Siecken en één uit de Sint-Niklaasparochie (Tabel 4). De beperkte mate van verwantschap tussen verschillende regio's in Vlaanderen ondersteunt de hypothese dat de verwantschappen tussen Hooge Siecken en de Sint-Niklaasparochie eerder lokale rekrutering weerspiegelen dan een bredere verspreiding van populaties of vals positieve verwantschapsrelaties.

Hoewel IBIS ontworpen is voor verwantschappen tot en met de zesde graad, detecteerde het programma ook enkele verwantschappen in zevende graad. Naarmate verwantschappen verder afstaan, wordt het immers steeds moeilijker om ze te detecteren en te classificeren. Zo detecteert IBIS derdegraadsverwanten nog in 95,5% van de gevallen, maar daalt de accuraatheid voor vijfdegraadsverwanten al tot 67%. Dit wijst op de beperkte betrouwbaarheid van zevendegraads-verwantschappen, die vaak vals positief blijken of verwarring geven met andere verwante gradaties. Om het vertrouwen te verhogen, moet gekeken worden naar het aantal en de lengte van gedeelde IBD-segmenten. IBIS erkent zelf dat kortere segmenten (<7 cM) vaker foutief gedetecteerd worden, terwijl segmenten >7 cM als betrouwbaar worden beschouwd. Voor verwantschappen tot en met de vijfde graad, met

hoge aantallen en sommen van segmenten >7 cM (Tabel 4), zijn de resultaten dus robuust. Verwantschapsrelaties in de zesde graad zijn aannemelijk (bijv. 78 cM in gedeelde segmenten >7 cM), al blijft de exacte graad onzeker. In tegenstelling daarmee zijn verwantschappen in zevende graad veel moeilijker te onderscheiden van toevallig identieke segmenten, evenals in moderne datasets met hoge kwaliteit.

Vanuit het project “*The make-up of the city*” (VUB) werden twee individuen uit de Sint-Niklaasparochie geselecteerd voor ons genetisch onderzoek, omdat ze beide een opvallende dentale afwijking vertoonden: de aanwezigheid van een extra snijtand (mesiodens). Op basis van deze gedeelde zeldzame eigenschap werd verondersteld dat deze twee individuen mogelijk nauw aan elkaar verwant waren. Genetische verwantschapsanalyse toonde echter aan dat deze twee individuen géén nauwe of verre verwantschap deelden. Deze uitkomst is niet verrassend, aangezien mesiodens — hoewel het familiaal kan voorkomen — ook een relatief frequente variant is in de algemene populatie, met een geschatte prevalentie van ca. 5%. De gedeelde tandafwijking hoeft dus niet noodzakelijk een genetisch verwantschapspatroon te weerspiegelen.

d) *Runs of Homozygosity* (ROH) als maat voor inteelt

Leprozerieën werden waarschijnlijk niet uitsluitend bewoond door personen met lepra, maar ook door mensen met andere aandoeningen. Dit opent de mogelijkheid op een verhoogde frequentie van individuen waarvan de ouders verwanten waren van elkaar – ouderlijke verwantschap, aangezien inteelt het risico op aangeboren afwijkingen kan verhogen.

Om dit te evalueren werd de ouderlijke verwantschap geanalyseerd via het meten van *runs of homozygosity* (ROH). Dit zijn lange, homozygote segmenten in het genoom die wijzen op overerving van identieke genetische kopieën van beide ouders. De tool hapROH werd toegepast op 31 individuen met voldoende dekking (> 400.000 overlappende SNPs).

Bij één individu uit Hooge Siecken (YP1366) werd een ROH-segment van 20,82 cM gevonden. Dit overschrijdt net niet de grens voor nauwe ouderlijke verwantschap (bijvoorbeeld kinderen van neven/nichten of grootneven/nichten), waarvoor men doorgaans ROH-segmenten verwacht van minstens 20 cM en een cumulatieve ROH-lengte van meer dan 50 cM. Toch suggereert deze bevinding afstamming van ouders die op grotere afstand verwant zijn (vierdegraads verwanten of dichter).

In het Sint-Niklaaskerkhof werd bij een individu (SN2276) een maximum ROH-segment van 19,12 cM gevonden, samen met een segment van 13,31 cM en één van 5,80 cM. Zowel in Hooge Siecken als in de Sint-Niklaasparochie werden meerdere ROH-segmenten rond 5 cM aangetroffen, maar bij geen enkel individu bedroeg de totale ROH-lengte meer dan 50 cM. Er werden dus geen duidelijke gevallen van inteelt vastgesteld.

e) Uniparentale haplogroepen

Uniparentale markers geven een eerste indicatie van de genetische diversiteit binnen de populatie van Ieper. Mitochondriale haplogroepen konden worden bepaald voor 83 individuen met een mitochondriale DNA-dekking van meer dan 10x. De meest voorkomende haplogroep was H (n = 34), wat overeenkomt met de dominante haplogroep in de hedendaagse Vlaamse autochtone bevolking. Andere veelvoorkomende haplogroepen waren HV, I, J, K, T en U — allemaal eveneens representatief voor de huidige autochtone bevolking in Vlaanderen.

Bij de individuen met voldoende dekking voor het Y-chromosoom (n = 49), behoorde de meerderheid (n = 36) tot haplogroep R, de meest voorkomende mannelijke haplogroep in het hedendaagse autochtone Vlaanderen. Daarnaast werden ook de haplogroepen I, G, E2 en J geïdentificeerd. De verdeling van uniparentale haplogroepen in de populatie van Hooge Siecken vertoonde sterke gelijkenissen met die van de Sint-Niklaasparochie, wat erop wijst dat er in Hooge Siecken geen grotere genetische diversiteit aanwezig was dan in de stadspopulatie van de Sint-Niklaasparochie.

Uniparentale markers dienden ook als bevestiging voor verwantschappen die eerder op basis van autosomale DNA-data waren vastgesteld. Zo werd een paar uit de Sint-Niklaassite (SN3111 en SN3186) als tweedegraads verwanten geclassificeerd door IBIS, maar als eerstegraads verwanten door READ en KIN. Beide individuen deelden echter dezelfde mitochondriale haplogroep U5a1b+16362 én dezelfde Y-haplogroep R-BY13089, wat een eerstegraadsverwantschap (waarschijnlijk broers) ondersteunt. Een tweedegraadsrelatie zou enkel mogelijk zijn indien de ouders van één van beide individuen zelf verwant waren. De eerder uitgevoerde hapROH-analyse toonde echter geen tekenen van inteelt aan, waardoor die hypothese uitgesloten kan worden.

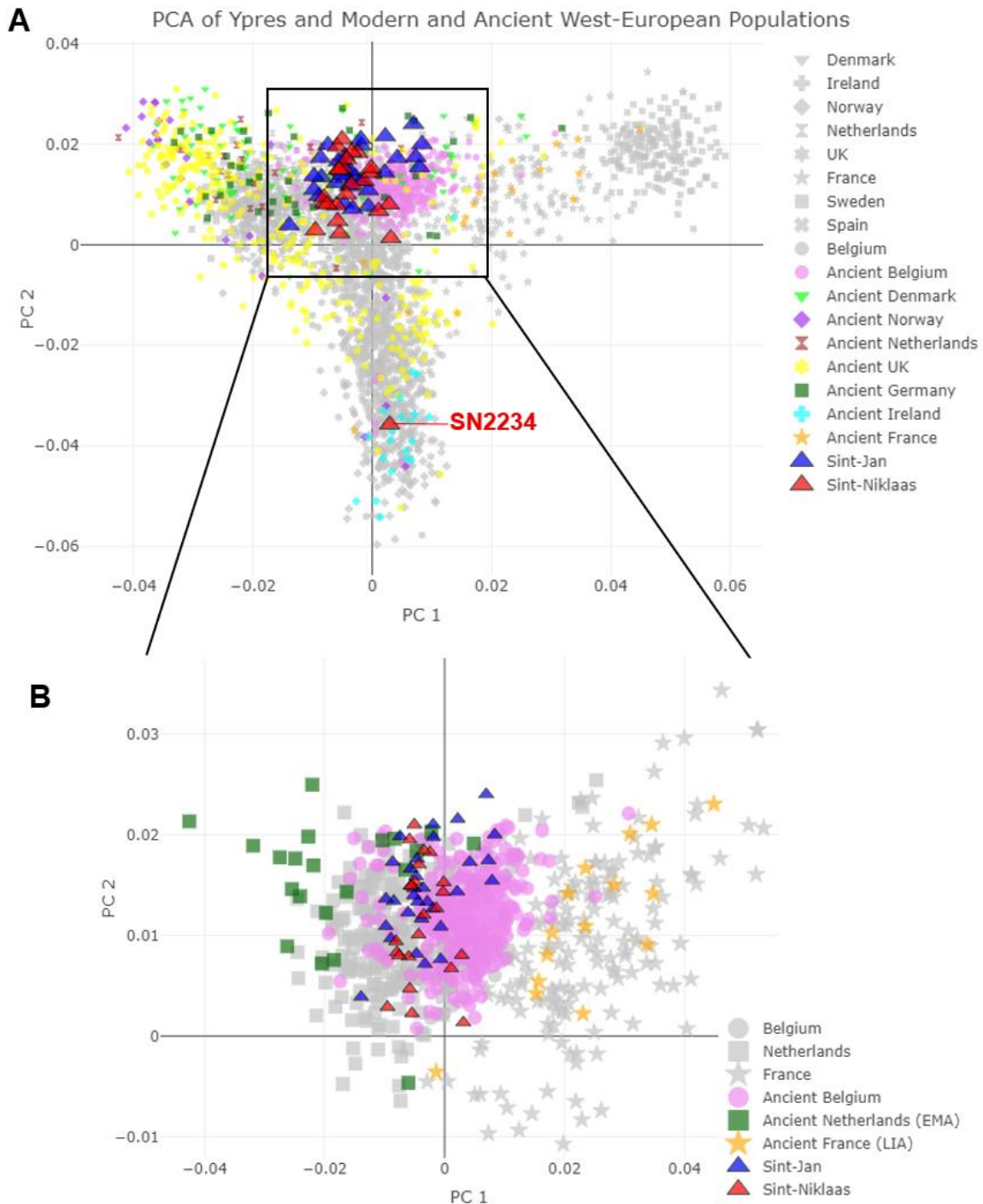
Andere verwante individuen deelden eveneens uniparentale markers. SN3052 en SN3242 hadden waarschijnlijk beide Y-haplogroep I1, maar verschilden in mitochondriale haplogroep, wat wijst op een vader-zoonrelatie — in overeenstemming met de resultaten van KIN en READ. Evenzo deelden SN2525 en SN2665 dezelfde mitochondriale haplogroep U5b1d1, wat de eerder vastgestelde eerstegraadsverwantschap ondersteunt, hoewel de Y-haplogroep van SN2525 niet kon worden bepaald wegens te lage dekking.

f) Afkomstanalyse

Om met hogere resolutie inzicht te krijgen in de ancestrale achtergronden van de individuen begraven op Hooge Siecken en in de Sint-Niklaasparochie in Ieper, werd gebruikgemaakt van autosomaal DNA voor een principaal component analyse (PCA). De PCA werd uitgevoerd op basis van geïmputeerde genomen van 58 individuen — 32 uit Sint-Jan en 26 uit Sint-Niklaas — die werden samengevoegd met een referentiepanel van zowel ancient als moderne Europese populaties (zie Tabel 2).

Eerst werd een verkennende PCA uitgevoerd met populaties uit Noord-, West- en Zuid-Europa om na te gaan of de Ieperse individuen binnen het Europese genetische spectrum vielen (Illustratie 25A). Deze analyse bevestigde dat alle individuen uit Ieper genetisch binnen de Europese clusters vielen. Eén individu uit de Sint-Niklaasparochie (SN2234) week

echter sterk af als outlier ($p = 9,92 \times 10^{-24}$, chi-kwadraattoets op basis van Mahalanobis-afstand): deze persoon clusterd met zowel vroegmiddeleeuwse als moderne Ierse individuen. Alle overige individuen clusteren dicht bij zowel ancient als moderne Belgische populaties, in het genetische spectrum tussen de ijzertijdpopulatie uit Frankrijk (LIA) en de vroegmiddeleeuwse populatie van Nederland (EMA) (Illustratie 25B).

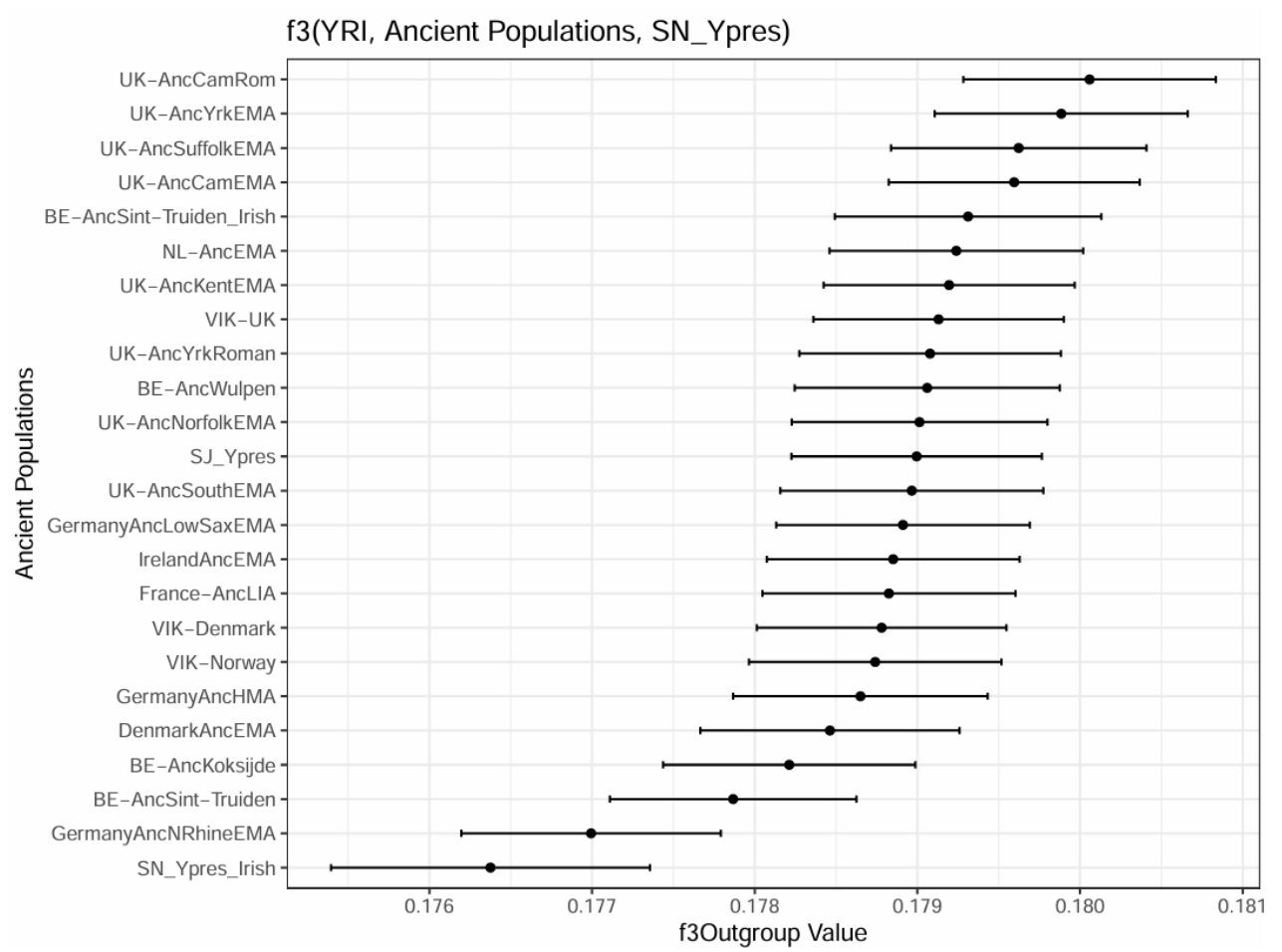


Illustratie 25 Principaal component analyse van leperse individuen en van laat-ijzertijd-, Romeinse en middeleeuwse populaties uit Europa. (A) PCA met moderne en ancient populaties uit Noord-, West- en Zuidwest-Europa. (B) PCA met omliggende populaties (Nederland, Frankrijk en België). ‘Sint-Jan’ wijst op de individuen uit het kerkhof van Hooge Siecken, ‘Sint-Niklaas’ wijst op de individuen uit het kerkhof van de Sint-Niklaasparochie in leper.

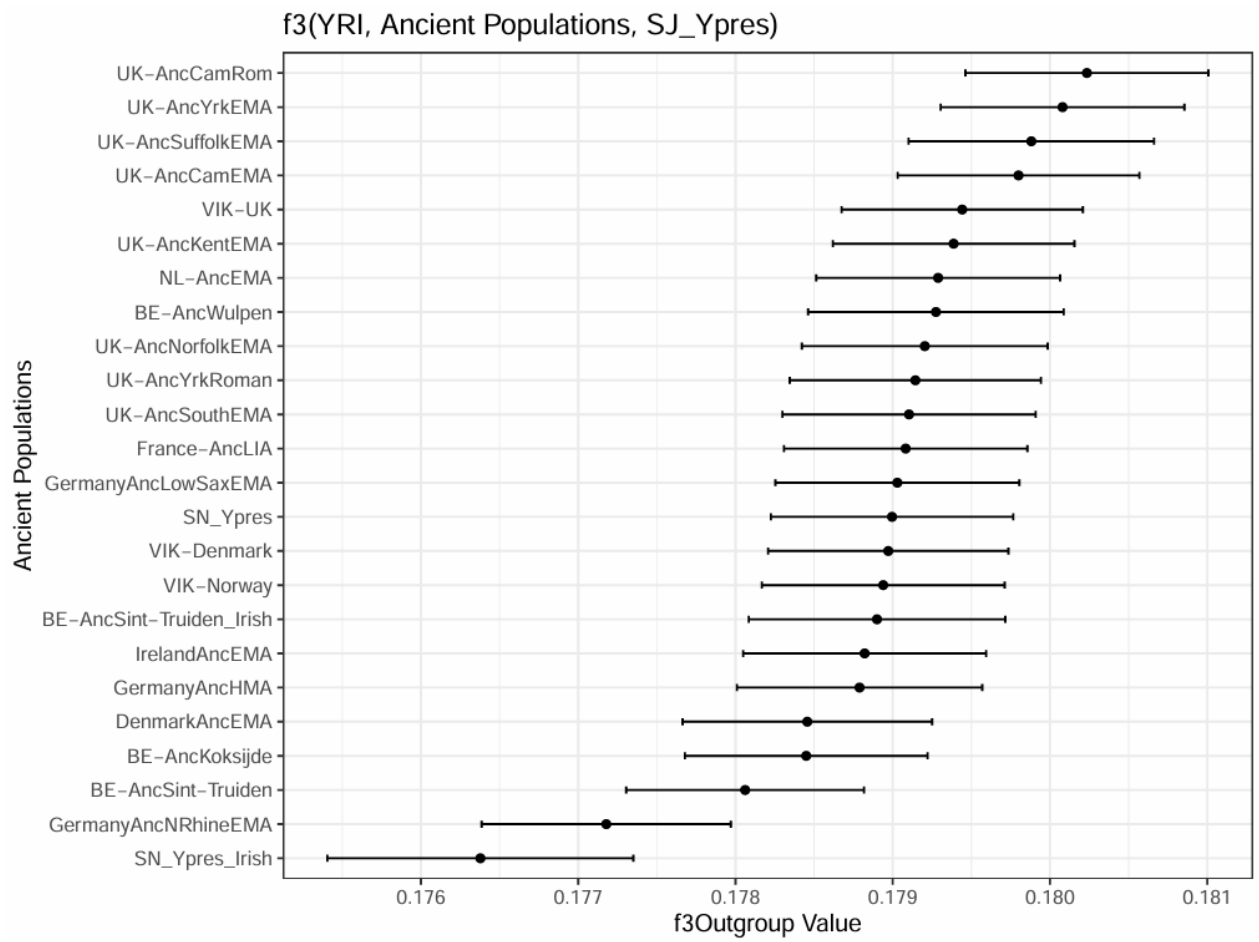
Om de ancestrale componenten van de leperse populatie verder te onderzoeken, werden outgroup f_3 - en f_4 -statistieken berekend. De outgroup f_3 -statistieken van de vorm $f_3(YRI, \text{ancient populaties}, \text{Sint-Niklaas/Sint-Jan})$ toonden aan dat beide sites, de Sint-Niklaasparochie en Hooge Siecken, een vergelijkbaar ancestraal profiel vertonen (Illustratie 26A en 26B).

Daarnaast werd individu SN2234 — de PCA-outlier — apart als target geanalyseerd. Deze analyse toonde aan dat SN2234 genetisch het meest verwant was aan de vroegmiddeleeuwse Ierse populatie, terwijl de overige leperse individuen veel minder Ierse voorouders vertoonden (Illustratie 26C). SN2234 deelde ook minder genetische drift met de andere leperse individuen dan die onderling, wat bevestigt dat SN2234 genetisch duidelijk verschilt van de overige populatie.

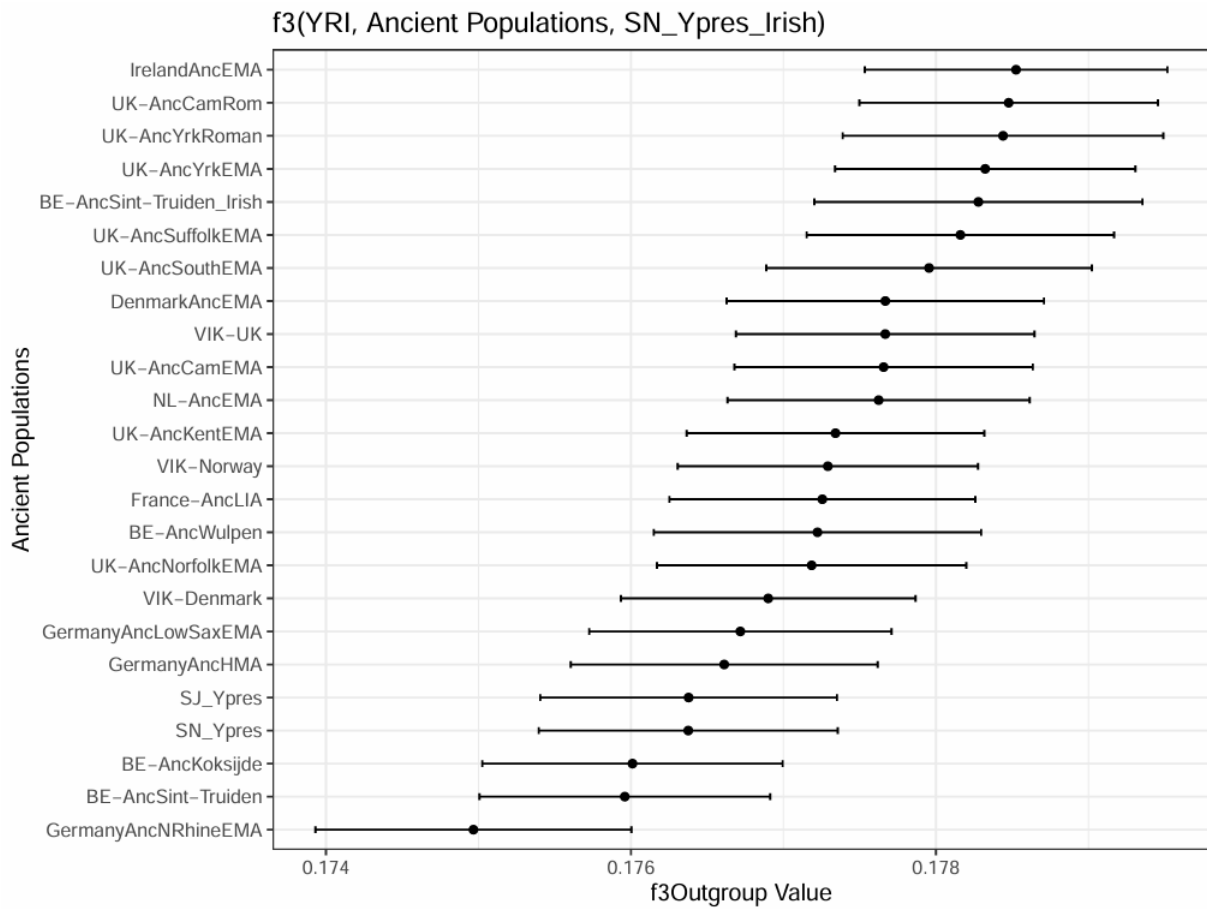
A.



B.



C.



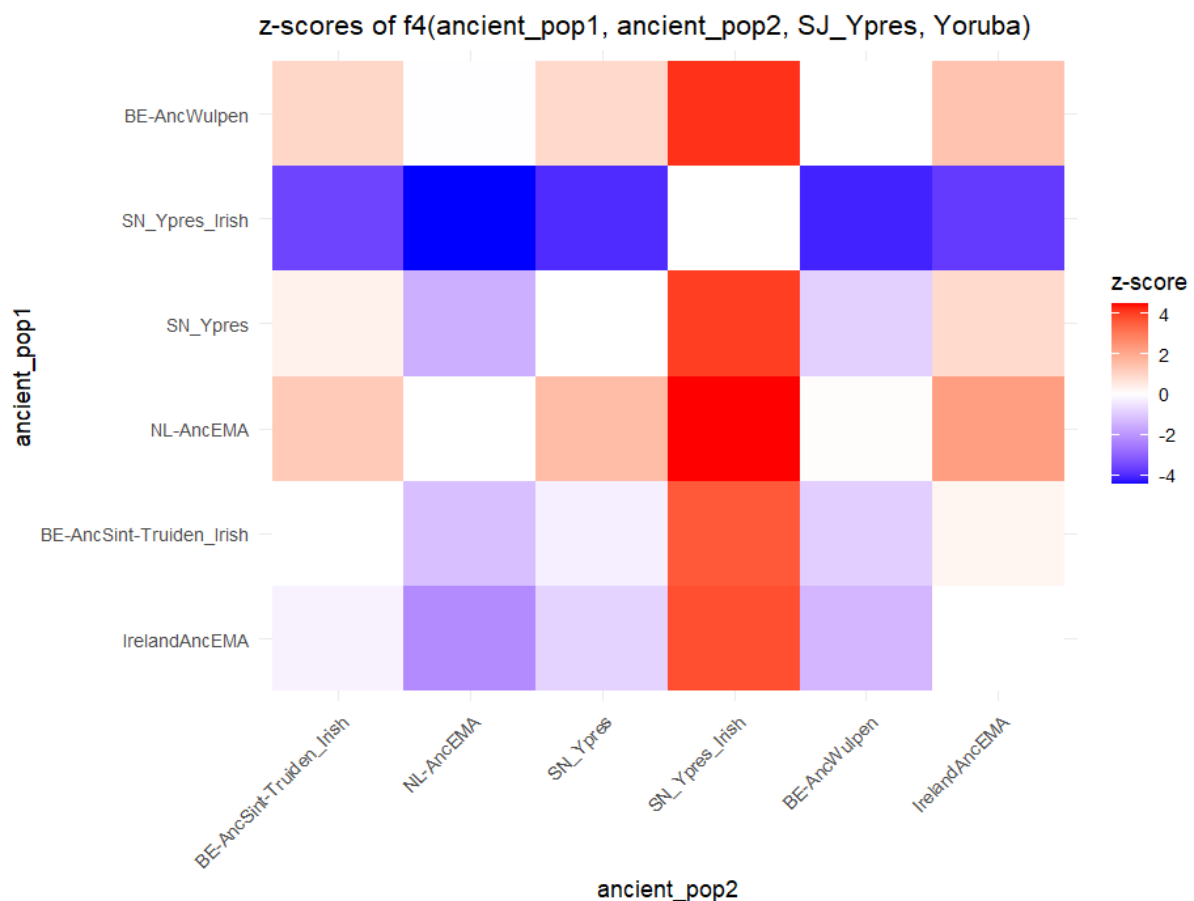
Illustratie 26 f_3 -statistieken van Ierse individuen met laat-ijzertijd-, Romeinse en middeleeuwse populaties als bronpopulaties (y-as), en Yoruba als outgroup [$f_3(\text{Yoruba}; \text{bronnpopulatie, target})$]. (A) Individuen van de Sint-Niklaasparochie als target; (B) Individuen van Hooge Siecken als target; (C) Individu SN2234 uit de Sint-Niklaasparochie, mogelijk van Ierse afkomst, als target. SJ = Hooge Siecken; SN = Sint-Niklaasparochie; EMA = vroege middeleeuwen; NL = Nederland; BE = België.

Aanvullend werden f_4 -statistieken berekend van de vorm $f_4(\text{ancient populatie 1, ancient populatie 2, Sint-Niklaas/Sint-Jan, YRI})$ om te bepalen met welke van twee bronpopulaties de Ierse individuen genetisch het meest verwant waren ten opzichte van de outgroup. Als testpopulaties voor deze f_4 -analyses werd een reeks West-Europese middeleeuwse populaties gebruikt, waaronder Ierland, Nederland, Ierse individuen uit Sint-Truiden, Wulpen en de andere Ierse individuen zelf.

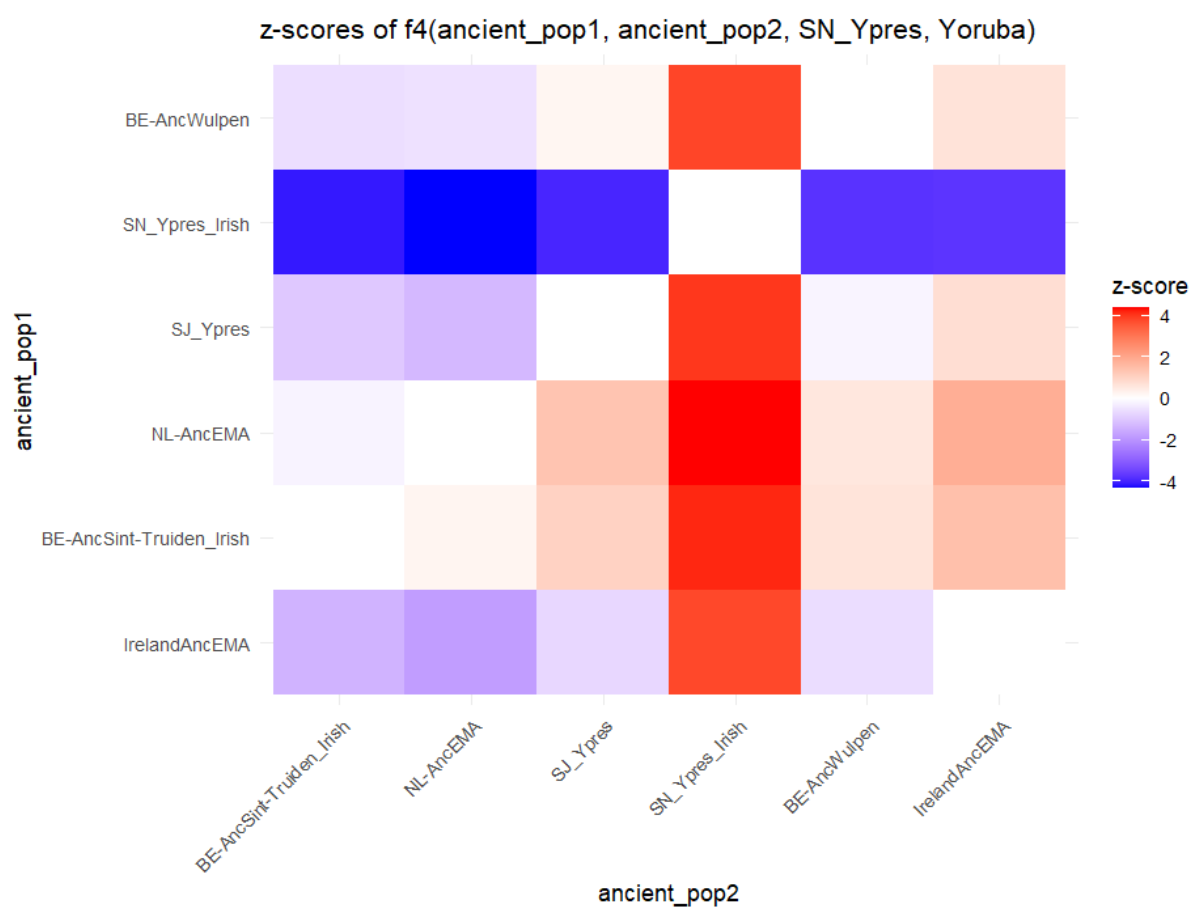
Deze analyses bevestigden dat de individuen uit het leprozeriekerkhof van Hooge Siecken en de parochie van Sint-Niklaasparochie een zeer gelijkaardig ancestraal profiel delen (Illustratie 27A en 27B). Hoe lager de z-score, hoe meer genetische verwantschap de targetpopulatie heeft met populatie 2 in vergelijking met populatie 1.

Dezelfde analyse werd uitgevoerd met individu SN2234 als target. Deze toonde een afwijkend profiel met een duidelijker genetische verwantschap met Ierse populaties, en minder met Belgische of Nederlandse referenties (Illustratie 26C).

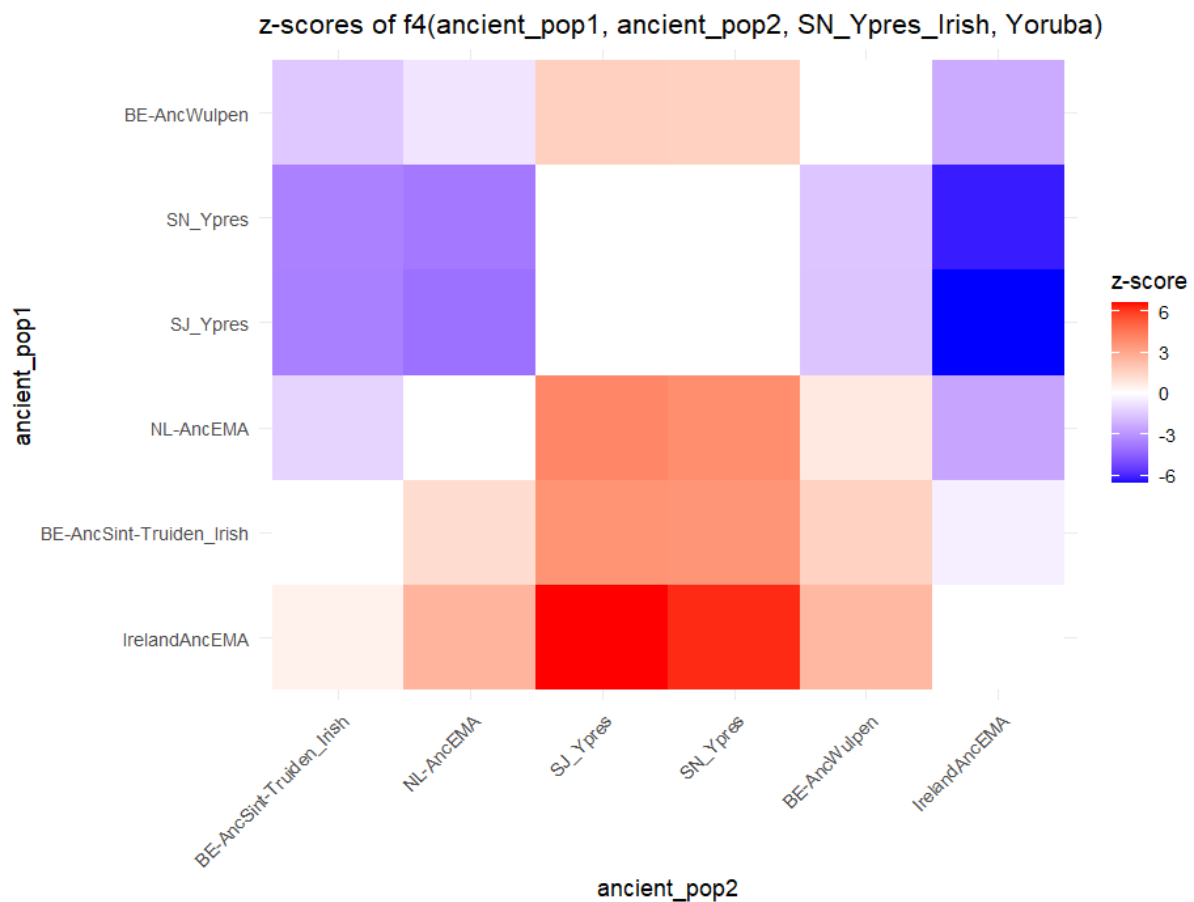
A.



B.



C.



Illustratie 27 Genetische verwantschappen van leperse individuen met middeleeuwse West-Europese populaties, op basis van f_4 -statistieken met Yoruba als outgroup [$f_4(\text{Populatie 1}, \text{Populatie 2}, \text{Target}, \text{Outgroup})$]. (A) Individuen van Sint-Jan als target; (B) Individuen van de Sint-Niklaasparochie als target; (C) Individue SN2234 uit Sint-Niklaas als target. SJ = Sint-Jan; SN = Sint-Niklaas; EMA = vroege middeleeuwen; NL = Nederland; BE = België.

V. Interpretatie genetische analyse voor afkomst en verwantschap

Een kernvraag van het syntheseproject *Besiekt ende Besmet* was of de middeleeuwse Vlaamse leprozerie de *Hooge Siecken* aan de rand van leper, functioneerde als instelling met een brede geografische aantrekkingskracht of eerder als lokale opvangplaats voor mensen uit de directe omgeving. Een verwante vraag betrof de sociale dynamiek binnen zulke instellingen: waren

de leprozen en andere aanwezigen op het domein — zoals verzorgend personeel, proveniers of andere opgenomen zieken — individuen die losgerukt waren uit hun familiale netwerken, of waren er verwanten — broers, zussen, ouders, kinderen – te vinden onder de begraven personen op het kerkhof van de *Hooge Siecken*?

Om deze vragen te beantwoorden, werden 123 individuen genetisch onderzocht: 70 uit het leprozeriekerkhof van *Hooge Siecken* (Sint-Jan) en 53 uit het parochiekerkhof van de Sint-Niklaaskerk (De Meersen), beide gelegen in middeleeuws leper. Door deze twee groepen met elkaar te vergelijken, konden niet alleen interne patronen worden geïdentificeerd, maar kon ook worden nagegaan of de leprozenpopulatie al dan niet afweek van de ‘gewone’ stedelijke bevolking.

Lokale herkomst van de leprozenpopulatie

De resultaten van de autosomale DNA-analyses – waaronder principaal component analyse (PCA) en f-statistieken – tonen aan dat alle onderzochte individuen, uit zowel de leprozerie als de parochie, genetisch nauw aansluiten bij andere middeleeuwse en hedendaagse populaties uit de regio die nu België en Noord-Frankrijk omvat.

De genetische homogeniteit van de leperse populatie contrasteert met eerdere observaties van een hoge diversiteit aan *Mycobacterium leprae*-stammen (de bacterie die lepra veroorzaakt) in andere Europese leprozerieën, zoals in Barcelona of Winchester. Die bevindingen voedden de hypothese dat middeleeuwse leprozerieën mensen van uiteenlopende herkomst aantrokken (Pfrengle *et al.* 2021). Voor *Hooge Siecken* geldt dat alvast niet: de bewonerspopulatie lijkt genetisch integraal te behoren tot de regio België en Noord-Frankrijk. Dit bevestigt wat de historische bronnen voor het graafschap Vlaanderen aangeven, namelijk dat de bewoners van de leprozerie van eigen stad of dorp afkomstig waren.

Een opvallende uitzondering werd gevonden in het parochiekerkhof van Sint-Niklaas: individu SN2234 had een genetisch profiel dat nauwer verwant was

aan vroegmiddeleeuwse en moderne Ierse populaties. Deze persoon werd nochtans via isotopen als lokaal geïdentificeerd in het project “*the make-up of the city*”, wat aangeeft dat ze waarschijnlijk in of nabij Ieper opgroeide. Genetisch wijst alles er op dat het individu afstamde van een relatief recente migrant uit Ierland. Dit benadrukt het belang van genetische gegevens naast isotopenonderzoek: mobiliteit kan zich immers generaties eerder hebben afgespeeld.

De aanwezigheid van een Ierse afstammeling in middeleeuws Ieper is niet verrassend. De stad kende een grote economische bloei in de 13de en 14de eeuw, mede dankzij de lakennijverheid, en maakte deel uit van een wijdvertakt netwerk van Europese handelsroutes. Zo werd Iers wol verhandeld richting Vlaanderen, terwijl dendrochronologisch onderzoek op het Sint-Niklaaskerkhof uitwees dat het hout van grafkisten afkomstig was uit onder andere Polen, Duitsland en het Rijn- en Maasgebied (Haneca and De Groote, 2024). Toch tonen de genetische gegevens vooral aan dat deze economische connecties slechts zelden gepaard gingen met blijvende migratie, gegeven dat we slechts één persoon vinden met een genetisch profiel dat wijst op een verre migratie. Zelfs in een stad met een uitgesproken kosmopolitisch karakter bleef de stedelijke bevolking genetisch opmerkelijk homogeen.

Geen verwanten in de leproserie, wel in de stad

Een tweede belangrijke onderzoeksvraag betrof de aanwezigheid van genetische verwantschap binnen de leprozenpopulatie. Indien mensen met lepra samen met familieleden naar het leproseriedomein verhuisden – al dan niet verplicht – dan zouden broers, zussen of ouders en kinderen genetisch als verwanten gedetecteerd worden.

De resultaten tonen een opvallend contrast tussen de twee sites. In de leproserie van *Hooge Siecken* werd geen enkele eerste-, tweede- of derdegraadsverwantschap vastgesteld. Geen enkel individu bleek dus een nauwe biologische verwant te hebben in dezelfde begraafplaats. Dit ondersteunt het historisch beeld van leproserieën als instellingen van afzondering, waar mensen met lepra van hun familie en gemeenschap

werden gescheiden — soms vrijwillig, maar vaak onder maatschappelijke of religieuze druk. Deze interpretatie wordt versterkt door de historische bronnen over het leprozeriereglement van Ieper, waarin ook huwelijk en gezinsvorming sterk werden gereguleerd of verboden (Vanhoutte *et al.* 2021).

In de Sint-Niklaasparochie daarentegen werd wél meerdere keren verwantschap vastgesteld. Zo werden verschillende ouder-kindrelaties, broers/zussen en derdegraads verwanten gedetecteerd. Dergelijke verwantschapsstructuren zijn wat men zou verwachten op een stedelijk parochiekerkhof, waar mensen vaak dicht bij hun familie woonden en overleden. De combinatie van genetische en uniparentale gegevens (mitochondriale en Y-chromosomale haplogroepen) bevestigde bovendien de verwantschapslijnen in meerdere gevallen.

Opmerkelijk is dat, ondanks deze duidelijke verschillen in nauwe verwantschap, er wel een aantal *verre verwantschappen* (vanaf 5de graad) gedetecteerd werd tussen individuen van *Hooge Siecken* en de Sint-Niklaasparochie. Dit bevestigt nogmaals dat beide populaties voortkwamen uit dezelfde bredere gemeenschap.

Genetische gezondheid

Naast directe verwantschap werd ook ouderlijke verwantschap geanalyseerd aan de hand van *runs of homozygosity* (ROH), waarmee kan worden nagegaan of de ouders van een individu genetisch verwant waren — wat dus kan wijzen op inteelt of een nauwe gemeenschap. In zowel de leproserie van Hooge Siecken als op het parochiekerkhof van Sint-Niklaas werden geen aanwijzingen gevonden voor nauwe ouderlijke verwantschap. Geen enkel individu vertoonde ROH-profielen die wijzen op inteelt op het niveau van neef-nicht- of oom-nichtrelaties. Twee individuen (één uit elke site) vertoonden wel enkele langere homozygote segmenten, die kunnen wijzen op een verwantschap tussen de ouders op het niveau van vierde graad of verder. Deze bevinding ondersteunt dat inteelt in middeleeuws Ieper zeldzaam was. Er werd dus ook géén verhoogde graad van inteelt vastgesteld in de leprozenpopulatie van Hooge Siecken — een belangrijk inzicht, aangezien sommige hypothesen suggereren dat genetische kwetsbaarheid

of familiale geïsoleerdheid mogelijk een rol speelde in ziektegevoeligheid en dus opname in leproserieën.

Opvallend is wél de detectie van een genetische aandoening bij een individu uit Hooge Siecken. Bij YP1366 werd een XXY-karyotype vastgesteld, wat wijst op het syndroom van Klinefelter — een chromosomale afwijking die typisch gepaard gaat met verminderde vruchtbaarheid, langere lichaamsbouw en verhoogde kans op cognitieve of hormonale afwijkingen. Dit individu vertoonde ook fysieke kenmerken die hiermee in lijn zijn, zoals een uitzonderlijk lange gestalte, slanke ledematen, weinig spieraanhechting en geen uitgesproken mannelijke kenmerken. Daarnaast vertoonde dit skelet letsels die passen bij lepra (zie verder in dit rapport). Deze combinatie roept interessante vragen op over de perceptie van lichamelijke afwijkingen in de middeleeuwse samenleving. Het is niet uitgesloten dat niet alleen de ziekte, maar ook het atypische lichaamsbeeld van deze persoon bijdroeg tot opname in de leproserie. Dit voorbeeld illustreert op treffende wijze hoe genetisch onderzoek onbekende medische profielen uit het verleden kan onthullen, en hoe het aanvullend werkt op klassieke skeletanalyse.

VI. Pathogenen

a. Fysisch antropologisch onderzoek door internationale specialisten in lepra Prof. Sarah Inskip en dr. Alette Blom (University of Leicester)

Een aanvullende, gespecialiseerde fysisch-antropologische analyse van de skeletten uit de site van Hooge Siecken was essentieel om de ambities van het project *Besiekt ende Besmet* te realiseren en resultaten van internationale kwaliteit te waarborgen. In totaal werden 103 individuen uit de opgraving onderzocht, waarbij de focus lag op een primaire selectie van 70 individuen die ook genetisch op *Mycobacterium leprae* werden getest (zie hieronder).

Methode

Voor dit onderzoek werd een nieuw, performanter scoringssysteem toegepast, dat toelaat om systematisch verschillende zones en types laesies te registreren en zo de mate en waarschijnlijkheid van lepra per individu te bepalen. Dit scoringssysteem is ontwikkeld door Prof. Sarah Inskip en dr. Alette Blom, die beiden gespecialiseerd zijn in de paleopathologie van lepra. Dr. Blom voerde de volledige osteologische analyse uit van de skeletten uit Hooge Siecken in het depot van het Agentschap Onroerend Erfgoed te Vilvoorde.

Deze werkwijze bood een unieke kans om de data van Hooge Siecken volgens dezelfde methodologie te vergelijken met andere recent onderzochte leproserieën in Europa. Dit geharmoniseerd scoringssysteem maakt het mogelijk om de resultaten uit Hooge Siecken systematisch naast die van andere recent onderzochte sites, zoals Barcelona, Winchester en Odense, te leggen (Pfrengle *et al.*, 2022). Zo kan de aard en ernst van lepralaesies niet alleen lokaal, maar ook in een breder Europees perspectief geëvalueerd worden.



Illustratie 28 Een van de vele skeletten uit de begraafplaats van Hooge Siecken, onderzocht door topexperts in fysisch-anthropologisch onderzoek naar lepra. Dit specifieke individu had een uitzonderlijke staat van de ruggengraat die de fysisch-anthropologen gebruikten voor hun onderzoek. Dankzij deze grondige analyse kon bij een groot deel van de individuen het ziektebeeld worden gereconstrueerd, waarbij vaak milde maar duidelijk herkenbare lepralaesies werden vastgesteld. Bron foto: Maarten Larmuseau.

De evaluatie bestond uit het detecteren van:

- De vijf types van laesies in het aangezicht, gelinkt aan het rhinomaxillaire syndroom (veranderingen aan de neusholte, het harde gehemelte en de bovenkaak):
 - ANS: Anterieure neustak (vooruitstekend botpunt onderaan de neusholte)
 - APM: Alveolaire processen van de maxilla (de tanddragende rand van het bovenkaaksbeen)
 - PPMN: Nasale zijde van het harde gehemelte
 - PPMO: Orale zijde van het harde gehemelte
 - NPI: Piriforme opening van de neus.
- Laesies aan de extremiteiten:

- NPBG: Nieuwe periostale botgroei in de armen en benen
- Specifieke veranderingen aan handen en voeten.

Op basis van een combinatie van deze scores werd elk skelet ingedeeld in vier categorieën:

- Geen lepra
- Mogelijke lepra (observatie van slechts enkele kenmerken)
- Waarschijnlijke lepra (observatie van verschillende kenmerken)
- Pathognomonische lepra – dit betekent dat er zeker bewijs is; pathognomisch betekent ‘typisch en uniek voor een bepaalde ziekte’

De methodologie hield rekening met de mate van bewaring, omdat veel skeletten gefragmenteerd waren.

De combinatie van craniaal en postcraniaal botonderzoek is cruciaal omdat laesies aan het aangezicht vaak pas in latere stadia ontstaan, terwijl veranderingen aan voeten en onderbenen zich soms al vroeger manifesteren. Deze geïntegreerde aanpak verhoogt de diagnostische betrouwbaarheid.

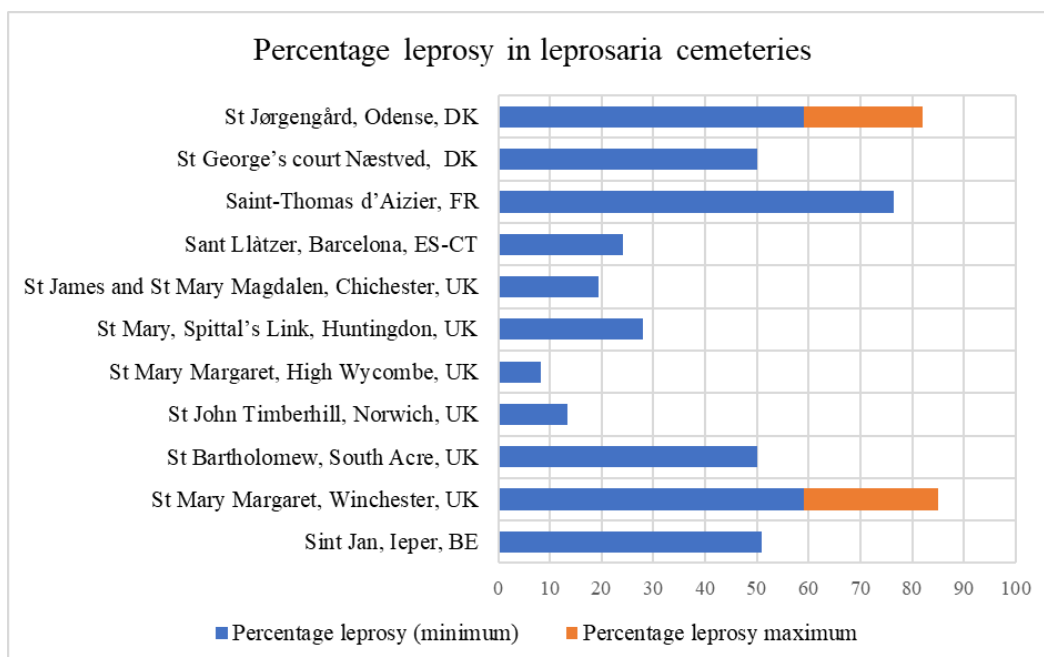
Resultaten

- Aantal individuen waarvoor volgende botfragmenten bewaard waren gebleven om mogelijke lepra laesies te observeren: 53 individuen (de overige skeletten waren te incompleet of gefragmenteerd).
- Diagnoseverdeling onder de 53 individuen:
 - Geen tekenen van lepra: 26 individuen (49,1%)
 - Mogelijke lepra: 23 individuen (43,4%)
 - Waarschijnlijke lepra: 2 individuen (3,8%)
 - Pathognomonische lepra: 2 individuen (3,8%).
- Prevalentie van laesies per zone:

- Rhinomaxillaire syndroom (RMS): aanwezig bij 43,3% van de geobserveerde individuen
- Nasale piriform opening (NPI): afwijkingen bij 60,7%
- NPBG in de benen: aanwezig bij meer dan de helft (52,4%)
- Voetlaesies: 64,5%
- Handlaesies: slechts 13,2%.

Opvallend is dat hoewel veel individuen milde tekenen van lepra vertoonden, er weinig zeer ernstige skeletlaesies voorkwamen. Ter vergelijking: in de leproserie van Winchester (VK) werd een groter aandeel skeletten aangetroffen met uitgebreide botdestructie, terwijl in Hooge Siecken een groter aandeel individuen enkel beginnende of matig uitgesproken laesies vertoonde. In vergelijking met andere Europese leproserieën van dezelfde grootte lijkt de populatie van de Hooge Siecken dus een hoge prevalentie van (lichte) lepralaesies te combineren met relatief milde ziekte-uitingen.

Een uitzondering op het algemene patroon van milde laesies vormt skelet **individu 48 (S896)**. Dit individu vertoonde het meest uitgebreide en ernstige ziektebeeld, met laesies in alle vijf onderzochte zones en vrijwel volledige resorptie van het harde gehemelte. Vermoedelijk had deze persoon daardoor ernstige beperkingen bij spreken, eten en dagelijkse verzorging. Hoewel we

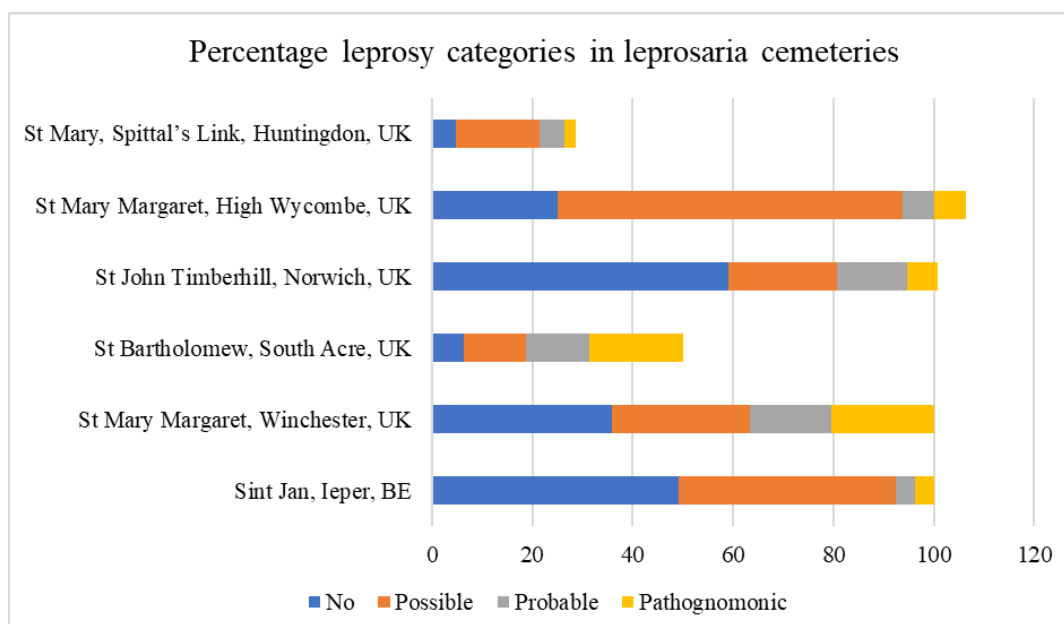


op basis van botmateriaal niets definitief kunnen zeggen over de toestand van de zachte weefsels, maken de verspreiding en ernst van de beenderlaesies het zeer waarschijnlijk dat er ook zichtbare huidletsels aanwezig waren. Het valt aan te nemen dat dit individu destijds vrij gemakkelijk werd herkend en gediagnosticeerd als een leprapatiënt. De zware aantasting moet een aanzienlijke impact hebben gehad op het dagelijks functioneren. De aanwezigheid in de Hooge Siecken suggereert dat deze persoon daar daadwerkelijk bijkomende hulp en ondersteuning heeft gekregen.

Illustratie 29 Vergelijking van het percentage individuen met lepra op middeleeuwse leprozeriekerkhoven in Europa. De blauwe balk toont het minimaal geschatte percentage op basis van pathognomonische en waarschijnlijke laesies (hiertoe behoren alle individuen gecategoriseerd onder ‘mogelijke lepra’, ‘waarschijnlijke lepra’ en ‘pathognomonische lepra’); de oranje balk geeft het maximaal geschatte percentage indien ook mogelijke laesies meegeteld worden. Hooge Siecken in ‘Sint-Jan, leper (BE)’ vertoont een hoge prevalentie, vergelijkbaar met andere gespecialiseerde instellingen zoals Winchester en Odense.

Interpretatie

Het skeletonderzoek bevestigt dat er op het kerkhof van Hooge Siecken een duidelijke selectie plaatsvond van individuen met tekenen van lepra. Het hoge aandeel skeletten met laesies ondersteunt dat de leprozerie primair was bedoeld voor de opvang en verzorging van leprapatiënten. Tegelijkertijd



valt op dat de meerderheid van de laesies relatief mild was. Dit kan wijzen op een praktijk van vroegtijdige opname, waarbij patiënten al in een eerder stadium van de ziekte werden toegelaten, of op regionale verschillen in de virulentie van *Mycobacterium leprae*.

Illustratie 30 Verdeling van de categorieën lepra-diagnose in verschillende middeleeuwse leprozeriekerkhoven. Elke kleur geeft het aandeel individuen aan zonder laesies (blauw), met mogelijke lepra (oranje), waarschijnlijke lepra (grijs) en pathognomonische lepra (geel). Hooge Siecken in ‘Sint-Jan, leper (BE)’ vertoont een relatief groot aandeel milde (mogelijke) laesies, terwijl sites zoals South Acre en Winchester vaker duidelijke, pathognomonische tekenen van lepra tonen.

Het relatief beperkte aantal individuen met pathognomonische lepra — dat wil zeggen laesies die uitsluitend bij lepra voorkomen — toont aan dat niet alle bewoners per definitie aan gevorderde vormen van de ziekte leden. Zoals ook uit historische bronnen blijkt, verbleven in leprozerieën vaak mensen bij wie de diagnose nog niet volledig was bevestigd, personen met twijfelachtige symptomen of anderen met chronische aandoeningen die aanleiding gaven tot afzondering. Dit onderstreept dat leprozerieën in de middeleeuwen niet alleen functioneerden als medische instellingen, maar ook als plekken van maatschappelijke segregatie.

Opvallend is dat de systematische registratie van lichte en matige laesies aantoont dat Hooge Siecken geen louter laatste toevluchtsoord was voor ernstig zieken. Integendeel, het kerkhof weerspiegelt ook een bredere zorgfunctie, waarin vroege gevallen werden opgevangen, opgevolgd en waarschijnlijk langdurig verzorgd.

b. Target sequencing voor lepra met onderzoeksgroep Prof. Verena Schuenemann (University of Basel)

In het kader van het *Besiecht ende Besmet* syntheseproject werd voor de detectie van *Mycobacterium leprae* een intense samenwerking opgezet met de onderzoeksgroep van Prof. Verena Schuenemann (Universiteit Basel),

wereldwijd erkend voor haar specialisatie in paleogenomisch onderzoek naar lepra. Hiervoor werd *targeted enrichment* toegepast, een techniek waarbij specifieke DNA-fragmenten van het lepra-genoom worden “gevist” uit het totaal aan oudDNA in een library. Deze methode maakt het mogelijk om, ook bij lage initiële hoeveelheden bacterieel DNA, voldoende sequentiedekking te bereiken voor verdere analyses, zoals genoomassemblage en fylogenetische vergelijking.

Voor de leprozerie van Hooge Siecken leverden de eerste screenings opmerkelijke resultaten op:

- Van de 70 onderzochte skeletten hadden 51 individuen een bruikbaar resultaat.
- Bij twee van deze 51 individuen werd een zeer hoge sequentiedekking behaald voor *M. leprae*. Dit betekent dat voor deze twee personen een vrijwel volledig lepra-genoom gereconstrueerd kon worden, wat meteen het **allereerste directe genetische bewijs van lepra in Vlaanderen** oplevert.
- Voor 32 van de overige 51 individuen werd wel *M. leprae*-DNA aangetroffen, maar nog onvoldoende om de aanwezigheid definitief te bevestigen of de bacteriestam te bepalen. Deze stalen worden momenteel verder onderzocht met diepere *targeted sequencing*. Dit proces neemt meerdere jaren in beslag, omdat telkens extra rondes van verrijking, sequencing en validatie nodig zijn.

Ter vergelijking werd hetzelfde protocol toegepast op 50 individuen uit het parochiekerkhof van Sint-Niklaas.

- Hier hadden 47 skeletten een resultaat.
- Bij 17 daarvan werden kleine hoeveelheden sequenties aangetroffen die mogelijk overeenkomen met *M. leprae*, maar waarschijnlijk gaat het hier grotendeels om contaminatie met bacterieel DNA uit de bodem. Ook deze stalen worden verder onderzocht, maar de verwachting is dat (bijna) alle signalen vals-positief zullen blijken.

De voorlopige interpretatie is dat de leproserie van Hooge Siecken inderdaad een voor Vlaanderen unieke vindplaats vormt, met duidelijke aanwijzingen voor lepra-infecties bij meerdere individuen. De relatief hoge frequentie van (mogelijk) positieve resultaten in Hooge Siecken sluit nauw aan bij de osteologische diagnose, die al een hoge prevalentie van lepra-gerelateerde botlaesies liet zien.



Illustratie 31 Skeletten uit Hooge Siecken waarvan tanden werden bemonsterd voor *targeted sequencing* op lepra-DNA. Deze methode leverde voor het eerst direct genetisch bewijs van lepra in middeleeuws Vlaanderen op. © agentschap Onroerend Erfgoed.

Het verdere *targeted sequencing* werk van Prof. Schuenemann en haar team is van groot belang om de fylogenie van de *M. leprae*-stammen beter te begrijpen. Zodra voldoende genoomgegevens beschikbaar zijn, zal onderzocht worden of verschillende bacteriële varianten in Hooge Siecken circuleerden. De hoge kostprijs van deze toekomstige analyses wordt gedragen door de onderzoeksgroep van Verena Schuenemann waarbij de eerste screening uit het syntheseproject de nodige aanzet is geweest.

Al deze gegevens bieden een unieke kans om de verspreiding en evolutie van lepra in Vlaanderen in kaart te brengen, en te vergelijken met de genetische afkomst en verwantschap van de patiënten die in dit project reeds uitgebreid onderzocht werden. Op die manier kan het onderzoek op termijn niet alleen bijdragen tot medische geschiedenis, maar ook tot een dieper inzicht in de sociale dynamiek, mobiliteit en epidemiologie in middeleeuws Vlaanderen.

Outreach

Om het syntheseproject *Besiekt ende Besmet* en de belangwekkende resultaten de nodige bekendheid te geven, werden diverse initiatieven ondernomen. Deze outreach richtte zich op uiteenlopende doelgroepen: academici, professionele archeologen, bedrijven, leerlingen uit het secundair onderwijs, erfgoedvrijwilligers en het brede publiek.

I. Wetenschappelijke publicaties in peer-reviewed tijdschriften

Reeds twee peer-reviewed artikels zijn gepubliceerd, en één artikel is opnieuw ingediend na minor revisions. Alle publicaties verschenen of verschijnen in toonaangevende internationale tijdschriften met een impact

factor hoger dan 10. Dat dit mogelijk was voor archeologische onderwerpen, is enkel dankzij het uitgesproken interdisciplinaire karakter, dat toponderzoek en uitzonderlijke resultaten mogelijk maakte.

- Sasso S., Saag L., Spros R., Beneker O., Molinaro L., Biagini S.A., Lehouck A., Van de Vijver K., Hui R., D'Atanasio E., Kushniarevich A., Niinemäe H., Metspalu E., Giullil M., Ali M.Q.A., Geypen J., Hoebreckx M., Berk B., De Winter N., Driesen P., Pijpelink A., Van Damme P., Scheib C.L., Deschepper E., Deckers P., Snoeck C., Dewilde M., Ervynck A., Tambets K.[#], Larmuseau M.H.D.[#], Kivisild T.[#] (2024). Capturing the fusion of two ancestries and kinship structures in Merovingian Flanders. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 121 (27): e2406734121. SCI I.F.: 11.5 (#Co-senior authors)
- Beneker O., Molinaro L., Guellil M., Sasso S., Kabral H., Bonucci B., Gaens N., D'Atanasio E., Mezzavilla M., Delbrassine H., Braet L., Lambert B., Deckers B., Biagini S.A., Hui R., Becelaere S., Geypen J., Hoebreckx M., Berk B., Driesen P., Pijpelink A., van Damme P., Vanhoutte S., De Winter N., Saag L., Pagani L., Tambets K., Scheib C.L.[#], Larmuseau M.H.D.[#], Kivisild T.[#] (2025) Urbanization and genetic homogenization in the medieval Low Countries revealed through a ten-century paleogenomic study of the city of Sint-Truiden. *Genome Biology*, 26: 127. SCI I.F.: 10.1 (#Co-senior authors)
- Guellil M., van Dorp L., Saag L., Beneker O., Bonucci B., Sasso S., Saupe T., Solnik A., Kabral H., Allmäe R., Bates J., Dittmar J.M., Ge X.J., Inskip S., Jonuks T., Karmanov V.N., Khartanovich V.I., Larmuseau M.H.D., Aneli S., Cessford C., Kriiska A., Mägi M., Malve M., De Winter N., Metspalu M., Pagani L., Robb J.E., Kivisild T., Houldcroft C.J., Scheib C.L., Tambets K. (Resubmitted after minor revisions). *Science Advances*, SCI I.F.: 11.7



Capturing the fusion of two ancestries and kinship structures in Merovingian Flanders

Stefania Sasso^{1,2}, Lehti Saag³, Rachel Sprö³, Owyn Beneker¹, Ludovica Molinaro¹, Simone A. Biagini⁴, Alexander Lehoucq⁵, Karen Van De Vijver⁶, Ruoyun Hui⁷, Eugenia D'Atanasio⁸, Helja Kabral¹, Ena Meštrović⁹, Helen Guellil¹⁰, Muhammad Q. A. Ali¹, Jan Geypen¹², Maxim Hoebeck¹³, Birgit Berk¹⁴, Natasja De Winter¹³, Petra Driesen¹³, April Pijpelink¹⁵, Philip Van Damme¹⁶, Christiana L. Scheib¹⁸, Evoud Deschepper¹, Pieterjan Deckers¹, Christophe Snoeck¹, Marc Dewilde¹, Anton Enrync¹, Kristina Tambets^{1,2,10}, Maarten H. D. Larmuseau^{1,10}, and Toomas Kivisild^{1,4,10}

Affiliations are included on p. 9.

Edited by Marcus Feldman, Stanford University, Stanford, CA; received April 3, 2024; accepted May 17, 2024.

The Merovingian period (5th to 8th cc AD) was a time of demographic, socioeconomic, cultural, and political realignment in Western Europe. Here, we report the whole-genome shotgun sequence data of 30 human skeletal remains from a coastal Late Merovingian site of Koksijde (675 to 750 AD), alongside 18 remains from two Early to Late Medieval sites in present-day Flanders, Belgium. We find two distinct ancestries, one shared with Early Medieval England and the Netherlands, while the other, minor component, reflecting likely continental Gaulish ancestry. Kinship analyses identified no large pedigrees characteristic to elite burials revealing instead a high modularity of distant relationships among individuals of the main ancestry group. In contrast, individuals with >90% Gaulish ancestry had no kinship links among sampled individuals. Evidence for population structure and major differences in the extent of Gaulish ancestry in the main group, including in a mother-daughter pair, suggests ongoing admixture in the community at the time of their burial. The isotopic and genetic evidence combined supports a model by which the burials, representing an established coastal nonelite community, had incorporated migrants from inland populations. The main group of burials at Koksijde shows an abundance of >5 cm long shared allelic intervals with the High Medieval site nearby, implying long-term continuity and suggesting that similarly to Britain, the Early Medieval ancestry shifts left a significant and long-lasting impact on the genetic makeup of the Flemish population. We find substantial allele frequency differences between the two ancestry groups in pigmentation and diet-associated variants, including those linked with lactase persistence, likely reflecting ancestry change rather than local adaptation.

Merovingian | kinship | ancestry | ancient DNA

Flanders emerged as a pivotal hub of European trade and the birthplace of capitalism by the end of the first millennium, marked by the rise of its coastal and inland waterway-connected cities (1). The name of the region, derived from an old Germanic root *flaema* meaning “inundated land”, reflects its nature as flood-prone coastal wetland along the North Sea. Historical and archaeological evidence confirms that the Merovingian period (450 to 750 AD) witnessed expansion of pioneer settlements in salt marshes on the coast and major changes in material culture, socioeconomic, and cultural frameworks and a linguistic transition from Gaulish to Germanic in the North Sea region as a whole (2–5). The terminological and chronological label of the “Merovingian period” is derived from the dynasty of the Merovingians. At the peak of their power, Merovingian kingdoms extended across modern France, Belgium, Netherlands, Luxembourg, and part of Germany. Changes in political power under the rule of these kings may have affected differently population continuity and mobility of upper and lower levels of social hierarchy.

Archaeological research has distinguished two Early Medieval cultural groups in present-day western Flanders, Belgium: 1) communities along the North Sea coast culturally aligned with the “North Sea culture”, a complex of shared types of material culture and language dialects (6), and 2) inland river basin communities culturally more aligned with northern France, the Meuse valley, and the Rhineland (7, 8). While these cultural traditions are well established, their interaction and demographic relationships as well as the extent to which the movement of people was crucial in establishing trade and cultural networks on the Flemish coast remains uncertain. Ancient DNA analyses of Anglo-Saxon sites in England have provided evidence of a large-scale migration from the continental North Sea zone (cNSs) during the Early Middle Ages that accounted for more than three-quarters

Significance

The extent and impact of Early Medieval population movements on the establishment of trade and cultural networks across the North Sea have been the subject of debate for centuries. Analyzing ancient genomes from the Flemish coast, we find two distinct ancestry groups merging in Late Merovingian community: the major group with a dense network of distant relationships among individuals and genetic affinity to populations around the North Sea coast and the minor group representing likely continental Gaulish ancestry of unrelated individuals from various inland sources. We also find evidence of local continuity suggesting that similarly to Britain, the Early Medieval population movements had a long-term impact and were integral to the formation of the Flemish population.

The authors declare no competing interests.

This article is a PNAS Direct Submission.

Copyright © 2025 the Author(s). Published by PNAS. This article is distributed under Creative Commons Attribution NonCommercial 4.0 International license (CC BY-NC-ND).

Although PNAS and authors adhere to United Nations naming conventions for maps (https://www.un.org/geopolicy/geopolitics/), our policy is to publish maps as provided by the authors.

S.S., K.T., M.H.D.L., and T.K. contributed equally to this work.

To whom correspondence may be addressed. Email: stefania.sasso@kuleuven.be, or simone.biagini@kuleuven.be, or toomas.kivisild@kuleuven.be.

This article contains supporting information online at https://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.2407341121/-/DCSupplemental.

Published June 24, 2025.

PNAS 2024 Vol. 121, No. 27, e2406734121

https://doi.org/10.1073/pnas.2406734121 1 of 10

RESEARCH

Open Access



Urbanization and genetic homogenization in the medieval Low Countries revealed through a ten-century paleogenomic study of the city of Sint-Truiden

Owyn Beneker^{1*}, Ludovica Molinaro¹, Meriam Guellil^{2,3}, Stefania Sasso⁴, Helja Kabral¹, Biancamaria Bonucci⁴, Noah Gaens¹, Eugenia D'Atanasio⁵, Massimo Mezzavilla⁶, Hélios Delbrassine⁶, Linde Braet¹, Bart Lambert⁷, Pieterjan Deckers⁸, Simone Andrea Biagini^{9,10}, Ruoyun Hui¹¹, Sara Becelaere¹, Jan Geypen¹², Maxim Hoebeck¹³, Birgit Berk¹⁴, Petra Driesen¹³, April Pijpelink¹⁵, Philip van Damme¹⁶, Sofie Vanhoutte¹⁷, Natasja De Winter¹³, Lehti Saag⁴, Luca Pagani¹⁶, Kristina Tambets⁴, Christiana L. Scheib¹⁸, Maarten H. D. Larmuseau^{1,14} and Toomas Kivisild^{1,4,14}

*Christiana L. Scheib, Maarten H. D. Larmuseau and Toomas Kivisild contributed equally to this work.

*Correspondence: owyn.beneker@student.kuleuven.be, maarten.larmuseau@kuleuven.be, toomas.kivisild@kuleuven.be

¹Department of Human Genetics, KU Leuven, Leuven, Belgium. Full list of author information is available at the end of the article

Abstract

Background: Processes shaping the formation of the present-day population structure in highly urbanized Northern Europe are still poorly understood. Gaps remain in our understanding of when and how currently observable regional differences emerged and what impact city growth, migration, and disease pandemics during and after the Middle Ages had on these processes.

Results: We perform low-coverage sequencing of the genomes of 338 individuals spanning the eighth to the eighteenth centuries in the city of Sint-Truiden in Flanders, in the northern part of Belgium. The early/high medieval Sint-Truiden population was more heterogeneous, having received migrants from Scotland or Ireland, and displayed less genetic relatedness than observed today between individuals in present-day Flanders. We find differences in gene variants associated with high vitamin D blood levels between individuals with Gaulish or Germanic ancestry. Although we find evidence of a *Yersinia pestis* infection in 5 of the 58 late medieval burials, we were unable to detect a major population-scale impact of the second plague pandemic on genetic diversity or on the elevated differentiation of immunity genes.

Conclusions: This study reveals that the genetic homogenization process in a medieval city population in the Low Countries was protracted for centuries. Over time, the Sint-Truiden population became more similar to the current population of the surrounding Limburg province, likely as a result of reduced long-distance migration



© The Author(s) 2025. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Illustratie 32 Twee internationale peer-reviewed artikels met een substantiële inbreng vanuit het syntheseproject *Besiect ende Besmet*.

Daarnaast zal er nog minstens één wetenschappelijke toppublicatie verschijnen over de resultaten uit Hooge Siecken en de Sint-Niklaasparochie:

- Gaens N. et al. (In voorbereiding) Genomic analysis of ancient individuals and pathogens from a medieval leprosarium in Ypres.

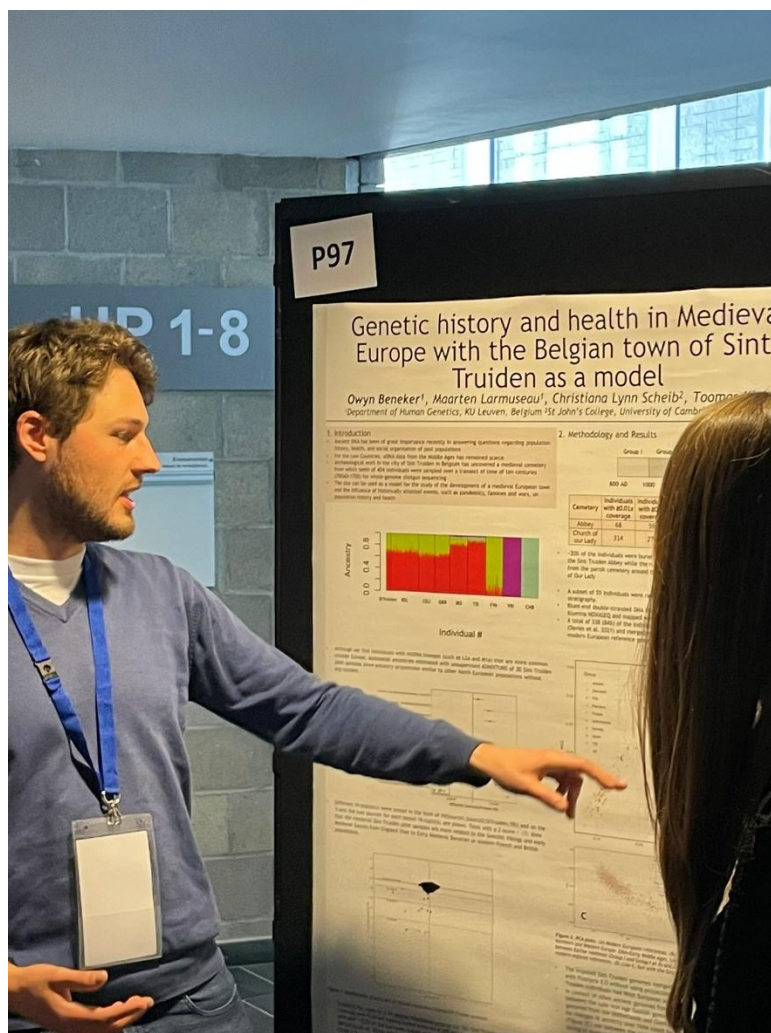
Anno juni 2025 werken Prof. Toomas Kivisild, Prof. Maarten Larmuseau en drs. Noah Gaens – in samenwerking met diverse nationale en internationale partners – ook aan andere artikels, onder meer over specifieke casestudies van Sint-Truiden, populatiegenetische analyses op alle Vlaamse oudDNA-stalen en doorgedreven metagenomische studies, inclusief de leperse en Truiense datasets uit *Besiect ende Besmet*.

II. Actieve deelnames aan wetenschappelijke congressen & professionele symposia

De resultaten van *Besiecht ende Besmet* zijn reeds op diverse wetenschappelijke congressen, workshops en professionele symposia actief voorgesteld via lezingen en posters. Daarbij werd veel aandacht besteed aan een brede disseminatie, zowel op archeologische als op genetische conferenties, zodat de interdisciplinaire bevindingen een zo ruim mogelijk publiek bereikten.

- **Poster presentatie op ISBA10 / 10th Meeting of the International Society for Biomolecular Archaeology “New horizons in Biomolecular Archaeology” – Tartu (Estland) – 13-16 September 2023:** Beneker O., Molinaro L., Guellil M., Sasso S., Kabral H., Bonucci B., Gaens N., D'Atanasio E., Mezzavilla M., Delbrassine H., Braet L., Lambert B., Deckers B., Biagini S.A., Hui R., Becelaere S., Geypen J., Hoebreckx M., Berk B., Driesen P., Pijpelink A., van Damme P., Vanhoutte S., De Winter N., Saag L., Pagani L., Tambets K., Scheib C.L.[#], Larmuseau M.H.D.[#], Kivisild T.[#] ([#]Co-senior authors). Genetic history and health in medieval Europe with the Belgian town of Sint-Truiden as a model.
- **Korte lezing op EMBO / EMBL Symposium “Reconstructing the human past: using ancient and modern genomics” – Heidelberg (Duitsland) – 17-20 september 2024:** Beneker O., Molinaro L., Guellil M., Sasso S., Kabral H., Bonucci B., Gaens N., D'Atanasio E., Mezzavilla M., Delbrassine H., Braet L., Lambert B., Deckers B., Biagini S.A., Hui R., Becelaere S., Geypen J., Hoebreckx M., Berk B., Driesen P., Pijpelink A., van Damme P., Vanhoutte S., De Winter N., Saag L., Pagani L., Tambets K., Scheib C.L.[#], Larmuseau M.H.D.[#], Kivisild T.[#] ([#]Co-senior authors). Urbanization and genetic homogenization in the medieval Low Countries revealed through a ten-century paleogenomic study of the city of Sint-Truiden.

- **Poster presentatie op EMBO / EMBL Symposium “Reconstructing the human past: using ancient and modern genomics” – Heidelberg (Duitsland) – 17-20 september 2024:** Sasso S., Saag L., Spros R., Beneker O., Molinaro L., Biagini S.A., Lehouck A., Van de Vijver K., Hui R., D’Atanasio E., Kushniarevich A., Niinemäe H., Metspalu E., Giullil M., Ali M.Q.A., Geypen J., Hoebreckx M., Berk B., De Winter N., Driesen P., Pijpelink A., Van Damme P., Scheib C.L., Deschepper E., Deckers P., Snoeck C., Dewilde M., Eryvynck A., Tambets K.[#], Larmuseau M.H.D.[#], Kivisild T.[#] ([#]Co-senior authors). Capturing the fusion of two ancestries and kinship structures in Merovingian Flanders.



Illustratie 33 PhD-student Owyn Beneker bespreekt actief de resultaten voor Sint-Truiden op BESHG in Leuven.

- **Geïnviteerde lezing op Archaeologia Mediaevalis 2025 – STAM Gent – 13 maart 2025:** Larmuseau M.H.D. Het vroegmiddeleeuws DNA van Vlaanderen en de meerwaarde van oudDNA-onderzoek voor de middeleeuwse archeologie.

- **Lezing op 6e Studiedag Syntheseonderzoek Archeologie – agentschap Onroerend Erfgoed – Herman Teirlinckgebouw Brussel – 4 april 2025:** Larmuseau M.H.D. *Besiect ende Besmet* – De pathogene synthese van een leproserie & andere middeleeuwse begraafplaatsen in Vlaanderen.

- **Geïnviteerde lezing op 20^{ste} BNA-contactdagen – Gallo-Romeins Museum, Tongeren – 8 en 9 mei 2025:** Larmuseau M.H.D. Het oudDNA-verhaal van Vlaanderen.

- **Poster presentatie op BESHG meeting 2024 – Leuven – april 2024:** Beneker O., Larmuseau M.H.D., Scheib C.L., Kivisild T. Genetic history and health in medieval Europe with the Belgian town of Sint-Truiden as a model.

- **Poster presentatie op Genetics & Genomics conference – Leuven – 26 juni 2025:** Gaens N., Pecnik J., Vanhoutte S., Schünemann V., Kivisild T. & Larmuseau M.H.D.

Ook in de toekomst zullen er uiteraard nog extra actieve bijdrages zijn, vooral om de resultaten van de leperse stalen uit het *Besiect ende Besmet*-project zo breed mogelijk onder de aandacht te brengen bij zowel academici als professionele archeologen.

Noah Gaens¹ Jaruschka Pecnik² Sofie Vanhoutte³ Verena Schünemann² Toomas Kivisild^{1,4} Maarten HD Larmuseau¹
¹ KU Leuven, Belgium ² University of Basel, Switzerland ³ agentschap Onroerend Erfgoed, Belgium ⁴ University of Tartu, Estonia

We analysed the genomes of 70 ancient individuals from the leprosarium and compared them to 53 genomes from the contemporaneous Sint-Niklaas parish cemetery in Ypres and other medieval sites across Flanders.



S914

XXY karyotype

Osteological markers consistent with Klinefelter syndrome

- tall stature
- dental abnormalities
- osteoporosis

Lesions consistent with Hansen's disease

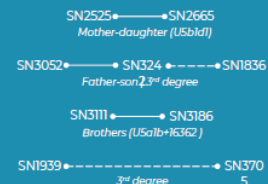


Significant male overrepresentation in Sint-Jan (one-tailed binomial test; $p = 0.0076$), poses questions on sex-selective admission.

No close relatedness in leprosarium

Absence of close relatedness in leprosanarium suggests separation from family upon admission and limited transmission of leprosy in households.

Much more close relatedness in Sint-Niklaas parish cemetery.



CONCLUSION: By integrating ancient genetic, bioarchaeological, and archaeo-historical data, this study offers a rare glimpse into the community of a prominent medieval leprosarium. Our findings illuminate demographic makeup, genetic relationships, and social dynamics within these widespread charitable institutions, providing key insights into medieval mobility, local social structures, and leprosy transmission and care.

III. Master- en Doctoraatsthesisen

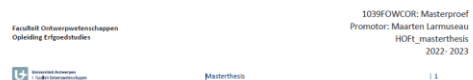
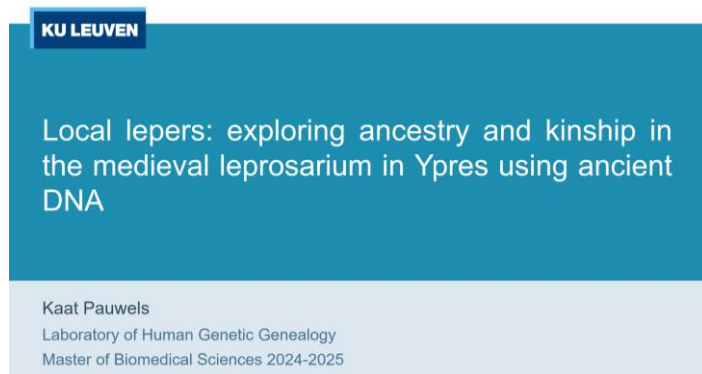
Twee masterthesissen werden gerealiseerd in het kader van *Besiect ende Besmet*:

- **Kaat Pauwels** – Master of Biomedical Sciences 2024-2025: “Local Lepers: Exploring ancestry and kinship in the medieval leprosarium in Ypres using ancient DNA”. Promotor: Prof. Maarten Larmuseau; Begeleider: drs. Noah Gaens.
- **Tess Hofman** – Master Erfgoedstudies 2022-2023: “Lepra in de middeleeuwen – Het erfgoed dat nog bewaard gebleven is”. Promotor: Prof. Maarten Larmuseau.



Masterthesis

Lepra in de middeleeuwen
Het erfgoed dat nog bewaard gebleven is.
Tess Hofman



Illustratie 35 Twee masterthesissen werden gerealiseerd in het kader van het syntheseproject en binnen twee opleidingen, namelijk Master of Biomedical Sciences (KU Leuven) en Erfgoedstudies (UAntwerpen).

De resultaten van *Besiect ende Besmet* dragen eveneens bij aan twee PhD-thesissen:

- **Owyn Beneker** – Verwachte datum voor de publieke verdediging: December 2025. Faculteit Geneeskunde – KU Leuven. Promotor: Prof. Toomas Kivisild; Co-Promotor: Prof. Maarten Larmuseau.

- **Noah Gaens** – Verwachte datum voor de publieke verdediging: anno December 2028. Faculteit Geneeskunde – KU Leuven. Promotor: Prof. Maarten Larmuseau; Co-Promotoren: Prof. Toomas Kivisild & Prof. Pieterjan Deckers.

IV. Publieke publicaties en lezingen

De resultaten van *Besiecht ende Besmet* werden reeds op tal van publieke lezingen verteld. Dit was in het kader van concrete evenementen of op vraag van organisaties en verenigingen:

- “Wat een DNA-match met een middeleeuwer betekent voor jouw familieverhaal?” – Larmuseau Maarten – **Famillement, CBG-centrum voor familiegeschiedenis**, Deventer, Nederland – 15 juni 2024.
- “Het zit in de genen! OudDNA werpt nieuw licht op het verhaal van Merovingisch Vlaanderen” – Larmuseau Maarten – **Spraakwater, Gallo-Romeins Museum**, Tongeren – 16 april 2025.
- “Het DNA-verhaal van Vlaanderen” – Larmuseau Maarten – **Archeologiedagen 2025** - Erfgoedhuis Kortenberg – Sint-Amanduskerk Dorpsplein Erps – 23 mei 2025.
- “DNA onderzoek op het Merovingisch grafveld in Koksijde” – Larmuseau Maarten – **Zeeuwse Archeologiedag 2024** – Middelburg, Nederland – 30 november 2024.
- “Neem me mee” met Dalilla Hermans en Maarten Larmuseau – **Theater aan Zee** – Oostende – 9 Augustus 2024.
- “Het DNA-verhaal van Vlaanderen” – Maarten Larmuseau – **Dag van de Wetenschap** – Zoo Antwerpen, Darwin zaal, Antwerpen – 23 november 2025.
- Publieke lezingen van Maarten Larmuseau aan volgende (middenveld)organisaties en verenigingen: **Davidfonds Academie**, **Davidfonds** (verschillende afdelingen), **Actueel Denken** (verschillende afdelingen), **Markant** (verschillende afdelingen), **Familiekunde Vlaanderen vzw** (verschillende afdelingen), **Universiteit Derde Leeftijd** (verschillende afdelingen), **NEOS** (verschillende afdelingen), **VLAS - Vlaamse Actieve Senioren**

(verschillende afdelingen), **Heemkundige kring Marcblas, Historische kring Kontich, bibliotheek Beveren, Stadsarchief Oudenaarde, ...** .

Naast lezingen werden de resultaten van *Besiekt ende Besmet* reeds beschreven in artikels voor het brede publiek in toegankelijke tijdschriften:

- “Hier rusten Valère en Marie. Nog één jaar.” – Larmuseau Maarten – **Reveil Tijdschrift** 3, p146-151 – November 2024.
- “Historisch DNA onthult eerste bewijs voor pest in middeleeuws Vlaanderen” – Larmuseau Maarten – **EOS Magazine** – Mei 2025.
- “Vooruitblik 2024 – Wie leefde in Sint-Truiden toen het nog Sarchinium heette? – Larmuseau Maarten – **EOS Magazine** - December 2023.
- “Een complexe structuur van afkomst en familiebanden in laat-Merovingisch Koksijde” – Larmuseau Maarten – **Vlaamse Stam**, 2024, 60, 3: p262-266.
- “De gouden combinatie van papieren archieven en oudDNA blijft ons nieuwe mogelijkheden bieden” – Larmuseau Maarten – **Vlaamse Stam**, 2024, 60, 4: p395-398.

V. Mediaberichten

De resultaten van *Besiekt ende Besmet* werden reeds uitvoerig via populaire mediakanalen verspreid. Vooral de eerste bewijzen van de pest in Vlaanderen werden op radio, TV, kranten en tijdschriften wereldkundig gemaakt.

Een overzicht van de media-kanalen:

- Interview **Kerk & Leven**: “Ons DNA bepaalt niet alles in ons leven” – geprint, 24 mei 2023, p7-8.
- TV-interview **Journaal VRT-Eén**: “DNA-onderzoek op skeletten” – 20 mei 2025, om 19u.
- Radio-interview De Wereld Vandaag op **VRT-Radio 1**: “Eerste pestepidemie in middeleeuws Vlaanderen” – 20 mei 2025.
- Radio-interview voor **Radio Nostalgie**: ‘Eerste bewijs voor pest in middeleeuws Vlaanderen’ – 20 mei 2025.

- Nieuwsbericht **VRT.NWS**: “KU Leuven vindt in Sint-Truiden eerste bewijs van pestepidemie in middeleeuws Vlaanderen” – 20 mei 2025.
- Interview **De Standaard**: “Vlaams DNA was 1.000 jaar geleden diverser dan nu” – online & geprint, 21 mei 2025.
- Interview **The Brussels Times**: “Digging up Belgium’s DNA: World’s largest study on medieval cemetery” – 28 juni 2025.
- Interview **De Morgen**: “Grootste DNA-onderzoek ooit op middeleeuwse begraafplaats: er was pest in Sint-Truiden” – online & geprint 21 mei 2025.
- Interview **De Limburger**: “DNA-onderzoek in Sint-Truiden levert direct bewijs op voor pestuitbraak in de middeleeuwen” – 20 mei 2025.
- Interview **Archaeology Magazine**: “Largest-ever medieval DNA study reveals genetic history of Belgian city” – 21 mei 2025.
- Interview **HLN**: “400 skeletten onderzocht...en dat levert het allereerste bewijs van pest in Vlaanderen op: ‘Het grootste DNA-onderzoek ter wereld’” - 20 mei 2025.
- Interview **Het Belang van Limburg & Het Nieuwsblad**: “Grootste DNA-onderzoek ooit op Truiense begraafplaats: ‘Duidelijk bewijs dat de pest ook hier heeft toegeslagen’” – 20 mei 2025.
- Interview **De Tijd**: “Zelfs DNA-deeltjes uit de lucht geven straks inkijk in het verleden” – 23 mei 2025.
- Interview **NewScientist**: “Opgraving op Sint-Truidense begraafplaats onthult duizend jaar geschiedenis” – 20 juni 2025.
- Interview **Knack** voor reeks zomerinterview – verschijnt in juli 2025.
- ...

ARCHEOLOGIE

⊕ Vlaams DNA was 1.000 jaar geleden diverser dan nu



Ooggravingen in Sint-Truiden, 2019. © aron

Senne Starckx

20 mei 2025 om 23:59

< Delen

DE TIJD Nieuws Beleggen Mijn Geld Sabato

Heidi Rakels, ex-topporter en ondernemer: 'Mensen beseffen niet hoe zwaar ondernemen kan zijn'

Onlinebank Medirect maakt hangmatbeleggen gratis deze zomer

NIEUWS | ONDERNEMEN

Zelfs DNA-deeltjes uit de lucht geven straks inkijk in het verleden

KOPIEREN LINK

(TWITTER)

BLUESKY

FACEBOOK

WHATSAPP

LINKEDIN

E-MAIL

BEWAAR

SCHENK DIT ARTIKEL

©BELGA_HANDOUT

STEPHANIE DE SMEDT

23 mei 2025 22:15

Illustratie 36 Het eerste bewijs voor de pest in middeleeuws Vlaanderen werd in mei 2025 veelvuldig in de Vlaamse pers beschreven.

VI. Tentoonstelling (W)onderland

Na de toekenning van *Besiect ende Besmet* ontstond het idee om in het Yper Museum een grote tijdelijke tentoonstelling over leperse archeologie te organiseren. Meteen werd het team van dit syntheseproject gevraagd actief mee te werken aan de ontwikkeling van deze expo, die in 2026 zal plaatsvinden onder de werktitel *(W)onderland*. Uiteraard nemen wij hierin een erg actieve rol op als officiële partner (Illustratie 37), en engageren wij ons om lezingen en teksten aan te leveren voor de geplande publicatie.

Partnerfiche – projectsubsidies cultureel erfgoed

CJM-CE-20180715

Departement Cultuur, Jeugd en Media
Afdeling Subsidieren en Erkennen
Arenbergstraat 9, 1000 BRUSSEL
T 02 553 68 42
cultureelerfgoed@vlaanderen.be
www.vlaanderen.be/erfgoed

Toelichting

Deze fiche wordt opgeladen als **bijlage** bij een aanvraag voor een projectsubsidie.

Per partner moet een fiche ingevuld en ondertekend worden. U moet dus een aparte fiche opstellen voor elke partner die bij het project betrokken is.

U laadt deze fiche, samen met de fiches van de eventuele andere partners, als bundel op in de online module KIOSK. Meer informatie over het samenvoegen van PDF-bestanden vindt u in de FAQ bij de projectsubsidies cultureel erfgoed.

Gegevens van de partner

1 Vul hieronder de gegevens van de partnerorganisatie in.

Geef elke partner waarmee u samenwerkt, een apart nummer.

nummer	naam partner
	Laboratory of Human Genetic Genealogy - Prof. Maarten H.D. Larmuseau
straat en nummer	ON4 Herestraat 49 - box 650
postnummer en gemeente	3000 Leuven
telefoonnummer	+32 494 397 297
e-mailadres	maarten.larmuseau@kuleuven.be
website	https://www.kuleuven.be/wieiswie/nl/person/00051557

2 Geef een korte beschrijving van de partner.

Het Laboratory of Human Genetic Genealogy (Departement Menselijke Erfelijkheid, KU Leuven) heeft expertise in ancientDNA linken aan geschiedenis en genealogie. Eén van de onderzoekspistes focust op ancientDNA analyse van individuen uit de middeleeuwse begraafplaatsen in Ieper, waaronder De Meersen (Sint-Niklaasparochie, centrum Ieper) en de leprozerie Hooge Siecken (Sint-Jan).

Rol en inbreng van de partner

3 Beschrijf gedetailleerd de rol van de partner in het project.

Wij bieden inhoudelijke en methodologische ondersteuning aan het project.

- Wij zullen (nog niet gepubliceerde) onderzoeksresultaten delen, uiteraard vertrouwelijk tot de tentoonstelling of tot de publicatie van de resultaten. Deze onderzoeksresultaten kunnen gebruikt worden voor de inhoudelijke invulling van de tentoonstelling.
- Wij zullen interessante cases en objecten signaleren voor in de tentoonstelling.
- Wij zullen zorgvuldig alle teksten voor de tentoonstellen redigeren, aanvullen en nalezen.
- Wij zullen meeschrijven aan de voorziene publicatie rond de tentoonstelling.

Illustratie 37 De officiële partnerfiche voor de tentoonstelling *(W)onderland* (werktitel) in het Yper Museum bevestigt dat de resultaten van *Besiecht ende Besmet* voor de Ieperse sites breed zullen worden verspreid.

In de aanloop naar deze tentoonstelling vonden al verschillende vergaderingen plaats met alle betrokken partners, waaronder het agentschap Onroerend Erfgoed. Ook werden diverse objecten geselecteerd om uit te lenen voor het genetische luik van de tentoonstelling, zoals oudDNA-werkmateriaal en een DNA-helixmodel. De resultaten van de Ieperse sites uit ons syntheseproject zullen zo op een toegankelijke manier voorgesteld worden aan het brede publiek.

VII. Luid Geratel

In de oorspronkelijke projectaanvraag van *Bsiect ende Besmet* werd het publieksluik aangekondigd onder de naam 'Luid Geratel'. Dit luik is tijdens het project volledig uitgewerkt in samenwerking met de oorspronkelijke partners Histories vzw, Damiaan Vandaag (organisatie achter Damiaanmuseum Tremelo), KU Leuven en het Yper Museum. Daarnaast sloot ook de onderzoeksgroep Arches – Erfgoedstudies aan de Universiteit Antwerpen actief aan bij de realisatie.

Luid Geratel heeft als doel het brede publiek op een toegankelijke manier kennis te laten maken met de rijke geschiedenis van lepra in Vlaanderen. Een bijzonder uitgebreide en interactieve website vormt het centrale platform. De website zal worden gelanceerd zodra de resultaten van de leperse sites uit *Bsiect ende Besmet* wetenschappelijk gepubliceerd en wereldkundig gemaakt zijn (verwacht: herfst 2026). Deze publiekswebsite zal dan bereikbaar zijn via www.luidgeratel.be en zal tevens als dossier opgenomen worden op www.familiegeschiedenis.be, waar het permanent beschikbaar blijft.

De website vertrekt vanuit een interactieve kaart van Vlaanderen waarop alle locaties aangeduid staan die een link hebben met lepra: archeologische sites, historische instellingen, en plaatsen waar nog zichtbaar onroerend erfgoed aanwezig is.

Luid geratel: lepra in Vlaanderen

Verken de rijke geschiedenis van lepra in Vlaanderen door op een van de locaties op de kaart te klikken of door de onderstaande hoofdstukken te bekijken.

In dit themadossier bieden we een uitgebreide schets van de context van lepra door de eeuwen heen en verbinden we die aan 16 locaties in Vlaanderen waar vandaag de dag nog steeds sporen van lepra te vinden zijn.

Ben je benieuwd hoe je dit themadossier kunt inzetten voor je genealogisch onderzoek? [Lees er meer over in onze bron over de visitatieregisters van leprozen!](#)



Wat is lepra?

Lepra is een **besmettelijke en chronische infectieziekte** veroorzaakt door de bacterie *Mycobacterium leprae*. Officieel heet lepra 'de ziekte van Hansen'. Vernoemd naar Gerhard Hansen, de Noorse arts die de staafvormige bacterie voor het eerst beschreef in 1873.

De geschiedenis van lepra

Symptomen van lepra

Lepra **ontwikkelt zich zeer traag**, waardoor iemand al jaren besmet kan zijn voordat de eerste symptomen zichtbaar worden. De bacterie tast meestal de huid en zenuwen aan in de koelere lichaamsdelen, zoals het gezicht en de ledematen.

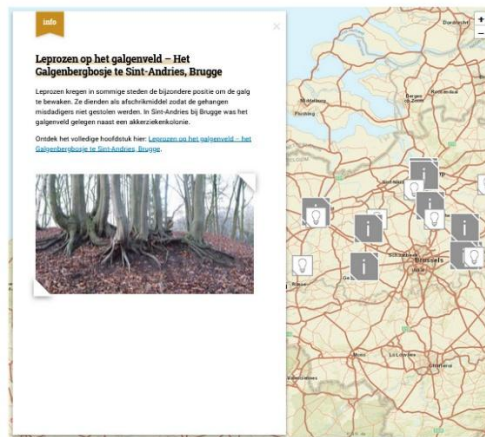
De ziekte kan uiteindelijk leiden tot **gevoelloosheid, huidafwijkingen, wonden en verslimmingen**. En in vergevorderde stadia kunnen zelfs de ruggengraat

Luid geratel: lepra in Vlaanderen

Verken de rijke geschiedenis van lepra in Vlaanderen door op een van de locaties op de kaart te klikken of door de onderstaande hoofdstukken te bekijken.

In dit themadossier bieden we een uitgebreide schets van de context van lepra door de eeuwen heen en verbinden we die aan 16 locaties in Vlaanderen waar vandaag de dag nog steeds sporen van lepra te vinden zijn.

Ben je benieuwd hoe je dit themadossier kunt inzetten voor je genealogisch onderzoek? [Lees er meer over in onze bron over de visitatieregisters van leprozen!](#)



Wat is lepra?

Lepra is een **besmettelijke en chronische infectieziekte** veroorzaakt door de bacterie *Mycobacterium leprae*. Officieel heet lepra 'de ziekte van Hansen'. Vernoemd naar Gerhard Hansen, de Noorse arts die de staafvormige bacterie voor het eerst beschreef in 1873.

De geschiedenis van lepra

Symptomen van lepra

Lepra **ontwikkelt zich zeer traag**, waardoor iemand al jaren besmet kan zijn voordat de eerste symptomen zichtbaar worden. De bacterie tast meestal de huid en zenuwen aan in de koelere lichaamsdelen, zoals het gezicht en de ledematen.

De ziekte kan uiteindelijk leiden tot **gevoelloosheid, huidafwijkingen, wonden en verslimmingen**. En in vergevorderde stadia kunnen zelfs de ruggengraat

Illustratie 39 Een interactieve kaart maakt het voor bezoekers van de website mogelijk om locaties in Vlaanderen te ontdekken die verbonden zijn met de geschiedenis van lepra.

Daarnaast bevat Luid Geratel een uitgebreide reeks hoofdstukken waarin de volledige geschiedenis van lepra, lepracultuur en leprabehandeling in Vlaanderen wordt toegelicht. Alle informatie is zorgvuldig nagekeken door historici en voorzien van duidelijke referenties naar de wetenschappelijke literatuur. Erfgoedvrijwilligers van talloze lokale heemkundige en archeologische kringen leverden waardevolle bijdragen in de vorm van foto's en aanvullende informatie. Erfgoeddeskundige drs. Anke Hellebuyck (Universiteit Antwerpen) maakte de inhoudelijke uitwerking van dit luik mogelijk.

Hoofdstukken binnen dit dossier

Afzondering en quarantaine – het Gentse Rijke Gasthuis

Na een diagnose veranderde het leven van een persoon met lepra drastisch. De quarantaine- en afzonderingsmaatregelen waren heel ingrijpend: de leproos moest zich fysiek uit de stad en de samenleving terugtrekken. En in een akkerziekenkolonie of een leprozerie gaan wonen. In dit hoofdstuk kom je te weten waarom de Rijke Gasthuisleprozerie van Gent zich aan de andere kant van de Leie bevond.

[Ga naar dit hoofdstuk](#)

Akkerzieken – Museum Mayer van den Bergh en de link met Pieter Bruegel

Als je als arme burger lepra kreeg, was het leven in een leprozerie vaak te duur. Gewone dorpingen leefden daarom als akkerzieke op het platteland buiten de stad. Ze leefden er in hutjes en versnoven als leproos het recht om te bedelen. Hoe dat er precies uitzag, wordt geïllustreerd in een schilderij van Bruegel in het Museum Mayer van den Bergh.

[Ga naar dit hoofdstuk](#)

De 'schouw' in een leprozerie – op visitatie in de Magdalenaleprozerie van Brugge

Bij een vermoeden van lepra moest je een medisch onderzoek ondergaan in de hoofdleprozerie van het gebied waarin je woonde. Op basis van uiterlijke kenmerken, zoals vermistte ledematen, werd de diagnose van lepra al dan niet toegekend. Kom meer te weten over hoe het onderzoek in zijn werk ging en wat de Magdalenaleprozerie van Brugge hier mee te maken heeft.

[Ga naar dit hoofdstuk](#)

De attributen en kledij van een leproos – het Gasthuismuseum in Geel

Een leproos kreeg een aantal attributen die die altijd bij zich moest dragen, zoals een klepper of ratel. Ook de kledij gaf aan dat iemand besmet was, met specifieke items zoals een hood of mantel. Het Gasthuismuseum in Geel biedt meer informatie over deze uitrusting en de betekenis ervan. Leer er alles over in dit hoofdstuk.

[Ga naar dit hoofdstuk](#)

De behandeling van lepra vroeger en nu – Dr. Hemerijckx uit Ninove

De behandeling van lepra ziet er vandaag helemaal anders uit dan in de middeleeuwen. Een pionier in die evolutie is Frans Hemerijckx, een Belgische dokter uit Ninove. Tijdens de jaren 1930 en 1940 rolt hij het kliniek onder de bomprinopie uit in onder andere Congo en India.

[Ga naar dit hoofdstuk](#)

De opoffering van Zuster Lambertine – klooster in Gijzegem

In Gijzegem bij Aalst staat vandaag nog steeds het klooster van de zusters van Sint-Vincentius a Paulo. In 1896 vertrok daar een groepje zusters naar Sao Paulo. Een van hen was Zuster Lambertine. Zij zette zich levenslang in voor de zorg voor kinderen met lepra. Dit hoofdstuk schetst het bewonderenswaardige, maar te vaak vergeten verhaal van Zuster Lambertine.

[Ga naar dit hoofdstuk](#)

Dood voor de wereld, levend voor God – de parochiekerk van Zoutleeuw

Na de diagnose moest een leproos afscheid nemen van de samenleving. Als afscheidsritueel werd soms een heuse begrafenis gedaan, waarbij de

Casus: het Gentse Rijke Gasthuis

De Rijke Gasthuisleprozerie te Gent is een van de oudste leprozerieën van Vlaanderen, opgericht in 1146. Die leprozerie was een **hoofdleprozerie**, net als de leprozerie van **leper, Brugge** en **Leuven**. Ze stond dus in voor het onderzoeken van mensen bij wie lepra vermoed werd. In die instelling konden goedge burgers terecht om afgescheiden van de samenleving te leven.

De Leie als natuurlijke barrière

Het Rijke Gasthuis te Gent lag bijvoorbeeld aan de andere kant van de Leie dan de stad zelf. De Leie vormt zo een natuurlijke barrière tussen de stad en de leprozerie. Die afstand was om de verspreiding van lepra tegen te gaan.

Toch lagen leprozerieën en akkerziekenkolonies ook vaak langs de drukke toegangswegen van de stad. Want de leprozen kregen recht om te bedelen en konden zo om aalmoezen bedelen bij passanten op de weg.

De statuten van de Rijke Gasthuisleprozerie

De statuten omvatten de **vele regels die aan leprozen werden opgelegd**. Bijvoorbeeld wanneer ze de leprozerie mochten verlaten en wanneer ze de stad binnen mochten. De statuten van de Rijke Gasthuisleprozerie dateren uit 1236 en zijn daarmee een van de oudste Middel nederlandse teksten die we exact kunnen dateren en lokaliseren.

Wat blijft er over van de Rijke Gasthuisleprozerie in Gent?

De Rijke Gasthuisleprozerie werd aan het begin van de 17de eeuw omgevormd tot een **bedelictessenschool**. Het **enige zichtbare overblijfsel van de leprozerie vandaag is de muur van de brouwerij**. Die bevindt zich niet in het grote gerestaureerde abdijcomplex, maar **aan de kant van de Doorniksestraat**. En de **hoek van de Kloosterstraat en de**



De statuten van de Rijke Gasthuisleprozerie. Foto: Rijksarchief.



Illustratie 40 De website en het dossier op *familiegeschiedenis.be* zullen bestaan uit een uitgebreide lijst hoofdstukken waarin de geschiedenis van lepra in Vlaanderen wordt beschreven.

Eenmaal de genetische resultaten van de leperse sites – en dus het eerste genetische bewijs van lepra in Vlaanderen – wetenschappelijk gepubliceerd zijn, zal Luid Geratel officieel gelanceerd worden. Het brede publiek krijgt dan de kans om nog ‘vergeten’ locaties met een link naar lepra in Vlaanderen toe te voegen aan de kaart (bijvoorbeeld straatnamen of schilderijen met een lepra-patiënt in kerk of museum).

Bovendien zal bij de lancering en onder leiding van Damiaan Vandaag een publiekscampagne plaatsvinden op de belangrijkste locaties in Vlaanderen die verbonden zijn met de geschiedenis van lepra. Toevallige passanten worden op die manier aangespoord om de website te bezoeken en zo niet alleen de resultaten van *Besiecht ende Besmet* maar ook het bredere historische verhaal te ontdekken. Een voorbeeld is het Magdalenagasthuis in Brugge, waar ook zichtbaar onroerend erfgoed de link met lepra tastbaar maakt (Illustratie 41).

De 'schouw' in een leprozerie – op visitatie in de Magdaleneleprozerie van Brugge

Als er in de middeleeuwen vermoed werd dat je lepra had, bijvoorbeeld door harduitslag, werd je naar de schouw gestuurd voor onderzoek. Dat onderzoek vond plaats in een van de vier hoofdproezerieën van Vlaanderen: in Ieper, Brugge, Gent en Leuven, elk verantwoordelijk voor een specifiek gebied. Ook in Torzeiken in Antwerpen werden dergelijke onderzoeken gehouden, hoewel dat officieel geen hoofdproezerie was. In Henegouwen gebeurde dat in de hoofdproezerieën van Bergen en Doornik. Voor de provincie Luik in Mont-Cornillon en voor de provincie Namen in Les Grands Malades in Namen.



een leprose (rechts) onderwerp, afgebeeld in een vroeg 14de eeuwse Frans manuscript door Maurice de Sully. Foto: Bibliothèque nationale de France, Département des manuscrits, Français, 167.

Wat is er vandaag nog te zien?

De Kapel Onze-Lieve-Vrouw van Nazareth en het aangrenzende Magdalengasthuis zijn overblijfselen van de Magdaleneleprozerie. Beide maakten deel uit van de zorginstelling die ontstond na het verenigen van het passantenhuis met de Magdaleneleprozerie in de 16de eeuw. In 2023 werden de kapel en het aangrenzende gasthuis volledig gerestaureerd. Vandaag maken ze deel uit van de infrastructuur van het Sint-Andreasinstituut.



De Kapel Onze-Lieve-Vrouw van Nazareth en het Magdalengasthuis in Brugge, voor de restauratie. Foto: Erikje Vanderhulst, ter beschikking gesteld door Agentschap Onroerend Erfgoed.

Referenties

- Behets, Paul. "Nemt dit clackerken ... Lepre in de omgeving van Vilvoorde en Mechelen." *Eigen Schoon & De Brabander* 104, nr. 1 (2021): 51-66.
- Boshart, Maurits. *De ziekte van Lazarus. Lepre in de middeleeuwen*. Soesterberg: Aspekt, 2017.
- Inventaris Onroerend Erfgoed. "Kapel Onze-Lieve-Vrouw van Nazareth en Magdalengasthuis." <https://inventaris.onroerenderfgoed.be/erfgoedobjecten/92074>
- Maréchal, Griet. "De leproten in de kwartieren Brugge en het Brugse Vrije: Nieuwe cijfers." *Handelingen van het Genootschap voor Geschiedenis* 116, nr. 3-4 (1979): 147-162.
- Maréchal, Griet. "Lepre-onderzoek in Vlaanderen (XIVe-XVIIe eeuw)." *Annales de la Société Belge d'Histoire des Hôpitaux* 14 (1976): 27-66.
- Persoons, Ernest, De Keyser, Walter en Van der Eycken, Michel. *Lepre in de Nederlanden (12de - 18de eeuw)*. Brussel: Algemeen

Illustratie 41 Voor elke locatie in Vlaanderen met een link naar lepra wordt uitgebreid aandacht besteed aan het erfgoed dat vandaag nog zichtbaar en vaak ook (beperkt) publiek toegankelijk is.

Het doel van 'Luid Geratel' is om de DNA-resultaten rond lepra in *Besiecht ende Besmet* publiekelijk en op een toegankelijke manier te verspreiden (Illustratie 42) en dit te koppelen aan de rijke geschiedenis en het (onroerend) erfgoed van Vlaanderen. Wij kijken uit naar de wetenschappelijke publicatie van de DNA-resultaten over de Hooge Siecken om dit intens voorbereidend publieksproject eindelijk te lanceren.

Project 'Besiecht ende besmet' en DNA als informatiebron – opgravingen in Ieper

Het project *Luid geratel* maakt deel uit van een groter syntheseproject *Besiecht ende Besmet*. Door verhalen te koppelen aan specifieke locaties in Vlaanderen wordt het erfgoed van lepra onder de aandacht gebracht. Prof. dr. Maarten Lamuseau (KU Leuven) staat in voor de coördinatie van dat syntheseproject. Het doel is om via DNA meer informatie te verzamelen over de middeleeuwse bevolking in het huidige Vlaanderen en de ziektes waarmee onze voorouders te maken kregen.

Archeologie en DNA als informatiebron

Sinds de coronapandemie zijn ziektekiemen, besmettingen en quarantainemaatregelen niet meer weg te denken uit ons dagelijks leven. Maar ook onze voorouders werden niet gespaard van overdraagbare ziektes en epidemieën, zoals lepra. Archeologisch onderzoek naar het oud DNA van ziektekiemen op skeletmateriaal kan ons nieuwe kennis bieden over de oorsprong, verspreiding en patronen van overdraagbare ziekten en epidemieën. Maar in het archeologisch landschap van Vlaanderen blijft dat aspect nog onbekend terrein. Tot nu dan.

Bij DNA-analyse kan het DNA van de skeletten die gevonden worden in archeologische opgravingen geanalyseerd worden. Maar ook ziekten zoals lepra, die veroorzaakt worden door een bacterie, laten sporen achter. Want ook bacteriën hebben DNA en dat blijft vaak bewaard, bijvoorbeeld in het tandsteen van een besmet persoon. Als we het DNA van een skelet analyseren, kunnen we daardoor zowel het DNA van die persoon bestuderen als het DNA van de ziektekiemen op het skelet.

Casus: de middeleeuwse Hoge Ziekenleprozerie te Ieper

In de 13de eeuw werd in Sint-Jan bij Ieper een leprozerie opgericht. In de eeuw daarvoor zou in Ieper al een eerste leprozenhuis bestaan hebben. Dat bevond zich ten noordwesten van de toenmalige Torhoutoort aan de Lanoe Torhoutstraat, ongeveer



Illustratie 42 Van zodra alle resultaten van de twee leperse sites uit *Besiecht ende Besmet* wetenschappelijk gepubliceerd zijn, zullen zij op de website van Luid Geratel op een toegankelijke manier raadpleegbaar zijn.

Conclusie

De kenniswinst die het syntheseproject *Besiecht ende Besmet* heeft opgeleverd, kan als volgt worden samengevat in twaalf stellingen:

1.

Het project heeft het enorme potentieel aangetoond van systematisch oudDNA-onderzoek naar ziektekiemen en pathogenen in de Vlaamse archeologie.

Voor het eerst werd direct genetisch bewijs gevonden van zowel pest als lepra in middeleeuws Vlaanderen, naast inzichten in andere pathogenen en in de werking van sociale maatregelen en instellingen zoals pestbegravingen en leprozerieën.

2.

De laat-Merovingische begraafplaats in Koksijde liet zien dat een uitzonderlijk genetisch diverse gemeenschap niet noodzakelijk gepaard ging met verschillen in infectieziekten.

Ondanks de aanwezigheid van twee duidelijke afkomstgroepen werden op deze site geen systematische verschillen in pathogenen vastgesteld.

3.

In Sint-Truiden werd voor het eerst pest-DNA in 14^{de} eeuw Vlaanderen aangetoond.

Opvallend was dat de personen met pestbesmetting verspreid lagen over het parochiale kerkhof en **niet geconcentreerd waren in massagraven**, wat wijst op regulier begravingsgebruik tijdens de epidemie.

4.

De pestepidemie in Sint-Truiden liet geen aantoonbaar populatiegenetisch effect achter.

Ook op het niveau van immuniteitsgenen werd geen blijvende verschuiving gedetecteerd, wat suggereert dat er geen grote genetische selectiedruk plaatsvond. Dit sluit aan bij de recente academische debatten over selectie-effecten bij de Zwarte Dood. Dit betekent echter niet dat de pest geen aanzienlijke impact op de populatiegrootte heeft gehad – integendeel.

5.

Een belangrijke innovatie in het project was de **reconstructie van volledige oude genomen van menselijke betaherpesvirus 6A en 6B**. Dit leverde wereldwijd het eerste directe bewijs op van deze virussen in middeleeuws Europa en bevestigde hun historische integratie in het menselijke genoom.

6.

In Hooge Siecken in leper werd **genetisch bewijs van lepra vastgesteld**, met reconstructie van volledige *Mycobacterium leprae*-genomen. Daarmee is voor het eerst in Vlaanderen ondubbelzinnig aangetoond dat leproserieën effectief leprapatiënten huisvestten.

7.

De skeletanalyse van Hooge Siecken toonde een **hoge prevalentie van lepralaesies, maar meestal in een relatief mild stadium**. In vergelijking met andere Europese leproserieën was de ernst gemiddeld beperkter, wat mogelijk wijst op vroegtijdige opname, verschillen in zorgkwaliteit of regionale verschillen in de virulentie van *M. leprae*.

8.

De bevolking van Hooge Siecken bleek genetisch lokaal, met zelfs verre verwantschapsbanden met individuen uit de Sint-Niklaasparochie in het centrum van leper.

Dit ondersteunt het beeld dat de leproserie vooral bewoners uit de eigen stedelijke gemeenschap en de brede omgeving opving.

9.

Tegelijk werd in Hooge Siecken geen enkele nauwe verwantschap (eerste tot derde graad) vastgesteld tussen de begraven individuen. **Dit bevestigt dat mensen met lepra veelal afzonderlijk van hun familie leefden en geïsoleerd werden in het leproseriedomein.**

10.

In de Sint-Niklaasparochie werd verrassend weinig genetische diversiteit vastgesteld, ondanks leper als belangrijk handelscentrum.

Slechts één individu vertoonde duidelijke genetische affiniteit met Ierland, wat erop wijst dat blijvende migratie eerder uitzonderlijk was.

11.

Zoals verwacht op een stedelijk parochiekerkhof, werden in de Sint-Niklaasparochie wel nauwe verwantschappen gedetecteerd. Ouderlijke en broer-zusrelaties kwamen frequent voor, **in lijn met de sociale structuur van een parochiegemeenschap.**

12.

Het project kende een **uitzonderlijk brede publiekswerking**. De resultaten werden reeds verspreid via internationale wetenschappelijke publicaties, publieke lezingen, mediaberichten en een permanente museale installatie voor jongeren. Een interactieve publiekswebsite (*Luid Geratel*) zal gelanceerd worden zodra de wetenschappelijke resultaten over lepra in Hooge Siecken gepubliceerd zijn. Ook de toekomstige tentoonstelling (*W)onderland* in het Yper Museum zal de publieke ontsluiting van deze leperse resultaten realiseren.

Synthese:

Door vier archeologische sites met uiteenlopende context – een Merovingisch grafveld (Koksijde), een stedelijk kerkhof over tien eeuwen (Sint-Truiden), een laatmiddeleeuwse leprozerie (*Hooge Siecken*, leper) en een laatmiddeleeuwse stedelijke parochie (Sint-Niklaasparochie leper) – op geïntegreerde wijze te onderzoeken, heeft *Besiekt ende Besmet* unieke inzichten opgeleverd over infectieziekten, genetische afkomst, verwantschap en maatschappelijke organisatie in middeleeuws Vlaanderen. Deze interdisciplinaire aanpak legt een stevig fundament voor toekomstig archeologisch onderzoek naar het verborgen verleden van pathogenen in onze regio.

Referenties

Abraham, G., Qiu, Y. en Inouye, M. (2017) 'FlashPCA2: principal component analysis of Biobank-scale genotype datasets', *Bioinformatics*, 33(17), pp. 2776–2778. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx299>.

Alaçamlı, E. *et al.* (2024) 'READv2: advanced and user-friendly detection of biological relatedness in archaeogenomics', *Genome Biology*, 25(1), p. 216. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1186/s13059-024-03350-3>.

Anastasiadou, K. *et al.* (2024) 'Detection of chromosomal aneuploidy in ancient genomes', *Communications Biology*, 7(1), p. 14. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05642-z>.

Aswad, A. *et al.* (2021) 'Evolutionary History of Endogenous Human Herpesvirus 6 Reflects Human Migration out of Africa', *Molecular Biology and Evolution*, 38(1), pp. 96–107. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa190>.

Auwerda, G. van der en O'Connor, B.D. (2020) *Genomics in the Cloud: Using Docker, GATK, and WDL in Terra*. O'Reilly Media, Incorporated.

Barton, A.R. *et al.* (2023) 'Insufficient evidence for natural selection associated with the Black Death', *bioRxiv*, p. 2023.03.14.532615. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1101/2023.03.14.532615>.

Beneker, O. *et al.* (2025) 'Urbanization and genetic homogenization in the medieval Low Countries revealed through a ten-century paleogenomic study of the city of Sint-Truiden', *Genome Biology*, 26(1), p. 127. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1186/s13059-025-03580-z>.

Bonczarowska, J.H. *et al.* (2022) 'Pathogen genomics study of an early medieval community in Germany reveals extensive co-infections', *Genome Biology*, 23(1), p. 250. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1186/s13059-022-02806-8>.

Bradt, T., Vanhoutte, S. en Couchez, K. (2021) 'Archeologisch onderzoek op de site Hoge Zieken in Sint-Jan (leper, W.-VL.): Archeologierapport van een opgraving vanuit wetenschappelijke vraagstelling volgend uit een toevalsvondst'.

Breitwieser, F.P., Baker, D.N. en Salzberg, S.L. (2018) 'KrakenUniq: confident and fast metagenomics classification using unique k-mer counts', *Genome Biology*, 19(1), p. 198. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1568-0>.

Brister, J.R. *et al.* (2015) 'NCBI Viral Genomes Resource', *Nucleic Acids Research*, 43(D1), pp. D571–D577. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1093/nar/gku1207>.

Broad Institute (2015) *Picard Tools*. Beschikbaar via: <https://broadinstitute.github.io/picard/> (Bekeken op: 21 oktober 2024).

Charles (1966) . 'La ville de Saint-Trond au moyen-âge, des origines à la fin du XIVe siècle'. Beschikbaar via: https://www.persee.fr/doc/rbph_0035-0818_1966_num_44_3_2648_t1_1049_0000_2 (Bekeken op: 30 Juni 2025).

Cochrane, G.R. en Galperin, M.Y. (2010) 'The 2010 Nucleic Acids Research Database Issue and online Database Collection: a community of data resources', *Nucleic Acids Research*, 38(suppl_1), pp. D1–D4. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1077>.

Coppola Bove, L. *et al.* (2024) 'A morphological and molecular approach to investigating infectious disease in early medieval Iberia: The necropolis of La Olmeda (Palencia, Spain)', *American Journal of Biological Anthropology*, 185(1), p. e24994. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1002/ajpa.24994>.

Danecek, P. *et al.* (2011) 'The variant call format and VCFtools', *Bioinformatics*, 27(15), pp. 2156–2158. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr330>.

Davies, R.W. *et al.* (2021) 'Rapid genotype imputation from sequence with reference panels', *Nature Genetics*, 53(7), pp. 1104–1111. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00877-0>.

De Groote, K. (ed) en Eryvynck, A. (ed) (2022) 'leper - De Meersen. Deel 1. Een kerk, kerkhof en abdij in de leperse binnenstad. Studie van de begravingen', *Onderzoeksrapporten agentschap Onroerend Erfgoed*, 229. Beschikbaar via: <https://oar.onroerenderfgoed.be/publicaties/OAOE/229/OAOE229-001.pdf>.

De Winter, N. (2023) 'Eindverslag Sint-Truiden Groenmarkt: Opgraving naar aanleiding van de herinrichting van de Groenmarkt, het Trudoplein, de Diesterstraat, Plankstraat en Meinstraat', *ARON-rapport*, 1258, p. 224.

Dewilde, M. *et al.* (2019) 'Een Merovingische nederzetting en grafveld aan de Vlaamse kust. Een toevalsvondst aan de Ter Duinenlaan te Koksijde. Eindverslag', *Onderzoeksrapporten agentschap Onroerend Erfgoed*, 117. Beschikbaar via:

<https://oar.onroerenderfgoed.be/publicaties/OAOE/117/OAOE117-001.pdf>.

Ewels, P. *et al.* (2016) 'MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report', *Bioinformatics*, 32(19), pp. 3047–3048. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354>.

Fischer, C.-E. *et al.* (2022) 'Origin and mobility of Iron Age Gaulish groups in present-day France revealed through archaeogenomics', *iScience*, 25(4), p. 104094. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104094>.

Fu, Q. *et al.* (2013) 'A Revised Timescale for Human Evolution Based on Ancient Mitochondrial Genomes', *Current Biology*, 23(7), pp. 553–559. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.02.044>.

García-Alcalde, F. *et al.* (2012) 'Qualimap: evaluating next-generation sequencing alignment data', *Bioinformatics*, 28(20), pp. 2678–2679. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts503>.

Ginolhac, A. *et al.* (2011) 'mapDamage: testing for damage patterns in ancient DNA sequences', *Bioinformatics*, 27(15), pp. 2153–2155. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr347>.

Gretzinger, J. *et al.* (2022) 'The Anglo-Saxon migration and the formation of the early English gene pool', *Nature*, 610(7930), pp. 112–119. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05247-2>.

Guellil, M. *et al.* (2024) '2500 Years of Human Betaherpesvirus 6A and 6B Evolution Revealed by Ancient DNA'.

Guellil, M. (2024) 'MeriamGuellil/aDNA-BAMPlotter: Fix in ED MQ>30'. Zenodo. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.5281/zenodo.5680936>.

Haneca, K. en De Groote, K. (2024) 'Ieper - De Meersen. Deel 5. Houten grafkisten, tonnen en gebruiksvoorwerpen: dendrochronologie, typologie en houtonderzoek', *Onderzoeksrapporten agentschap Onroerend Erfgoed*, 330. Beschikbaar via: <https://oar.onroerenderfgoed.be/publicaties/OAOE/330/OAOE330-001.pdf>.

- Harris, C.R. *et al.* (2020) 'Array programming with NumPy', *Nature*, 585(7825), pp. 357–362. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2649-2>.
- Hui, R. *et al.* (2024) 'Genetic history of Cambridgeshire before and after the Black Death', *Science Advances*, 10(3), p. eadi5903. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1126/sciadv.adi5903>.
- Hunter, J.D. (2007) 'Matplotlib: A 2D Graphics Environment', *Computing in Science & Engineering*, 9(3), pp. 90–95. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1109/MCSE.2007.55>.
- Katoh, K. *et al.* (2002) 'MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform', *Nucleic Acids Research*, 30(14), pp. 3059–3066. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1093/nar/gkf436>.
- Klunk, J. *et al.* (2022) 'Evolution of immune genes is associated with the Black Death', *Nature*, 611(7935), pp. 312–319. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05349-x>.
- Korneliussen, T.S., Albrechtsen, A. en Nielsen, R. (2014) 'ANGSD: Analysis of Next Generation Sequencing Data', *BMC Bioinformatics*, 15(1), p. 356. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1186/s12859-014-0356-4>.
- Larmuseau, M.H.D. *et al.* (2023) 'Syntar 13. Merovinger DNA. De genetische en archeologische synthese van een Merovingisch grafveld aan de Vlaamse kust', *Onroerend Erfgoed*. Beschikbaar via: <https://www.vlaanderen.be/publicaties/merovinger-dna-de-genetische-en-archeologische-synthese-van-een-merovingisch-grafveld-aan-de-vlaamse-kust>.
- Li, H. *et al.* (2009) 'The Sequence Alignment/Map format and SAMtools', *Bioinformatics*, 25(16), p. 2078. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>.
- Li, H. en Durbin, R. (2009) 'Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform', *Bioinformatics*, 25(14), pp. 1754–1760. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>.
- Lopez, J., Hovius, J.W. en Bergström, S. (2021) 'Pathogenesis of Relapsing Fever', *Current issues in molecular biology*, 42, pp. 519–550. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.21775/cimb.042.519>.

Magoč, T. en Salzberg, S.L. (2011) 'FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies', *Bioinformatics*, 27(21), p. 2957. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr507>.

Maier, R. *et al.* (2023) 'On the limits of fitting complex models of population history to f-statistics', *eLife*, 12, p. e85492. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.7554/eLife.85492>.

Mallick, S. *et al.* (2024) 'The Allen Ancient DNA Resource (AADR) a curated compendium of ancient human genomes', *Scientific Data*, 11(1), p. 182. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1038/s41597-024-03031-7>.

Martin, M. (2011) 'Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads', *EMBnet.journal*, 17(1), pp. 10–12. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>.

McCarthy, S. *et al.* (2016) 'A reference panel of 64,976 haplotypes for genotype imputation', *Nature Genetics*, 48(10), pp. 1279–1283. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1038/ng.3643>.

Minh, B.Q. *et al.* (2020) 'IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era', *Molecular Biology and Evolution*, 37(5), pp. 1530–1534. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>.

Mühlemann, B. *et al.* (2018) 'Ancient hepatitis B viruses from the Bronze Age to the Medieval period', *Nature*, 557(7705), pp. 418–423. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0097-z>.

Patterson, N., Price, A.L. en Reich, D. (2006) 'Population Structure and Eigenanalysis', *PLOS Genetics*, 2(12), p. e190. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020190>.

Pfrenkle, S., *et al.* (2021) *Mycobacterium leprae* diversity and population dynamics in medieval Europe from novel ancient genomes. *BMC Biology*, 19: 220. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1186/s12915-021-01120-2>.

Plotly Technologies Inc (2015) 'Collaborative data science'. Plotly Technologies Inc. Beschikbaar via: <https://plot.ly>.

Popli, D., Peyrégne, S. en Peter, B.M. (2023) 'KIN: a method to infer relatedness from low-coverage ancient DNA', *Genome Biology*, 24(1), p. 10. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1186/s13059-023-02847-7>.

Project MinE ALS Sequencing Consortium (2018) ‘Project MinE: study design and pilot analyses of a large-scale whole-genome sequencing study in amyotrophic lateral sclerosis’, *European Journal of Human Genetics*, 26(10), pp. 1537–1546. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1038/s41431-018-0177-4>.

Purcell, S. *et al.* (2007) ‘PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses’, *American Journal of Human Genetics*, 81(3), p. 559. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1086/519795>.

Quinlan, A.R. en Hall, I.M. (2010) ‘BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features’, *Bioinformatics*, 26(6), pp. 841–842. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033>.

Ringbauer, H., Novembre, J. en Steinrücken, M. (2021) ‘Parental relatedness through time revealed by runs of homozygosity in ancient DNA’, *Nature Communications*, 12(1), p. 5425. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25289-w>.

Roosen, J. en Curtis, D.R. (2019) ‘The “light touch” of the Black Death in the Southern Netherlands: an urban trick?’, *The Economic History Review*, 72(1), pp. 32–56. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1111/ehr.12667>.

Sarris, P. (2022) ‘Viewpoint New Approaches to the “Plague of Justinian”’, *Past & Present*, 254(1), pp. 315–346. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1093/pastj/gtab024>.

Sasso, S. *et al.* (2024) ‘Capturing the fusion of two ancestries and kinship structures in Merovingian Flanders’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 121(27), p. e2406734121. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1073/pnas.2406734121>.

Scheib, C.L. *et al.* (2024) ‘Low genetic impact of the Roman occupation of Britain in rural communities’, *Molecular Biology and Evolution*, 41(9), p. msae168. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1093/molbev/msae168>.

Schönherr, S. *et al.* (2023) ‘Haplogrep 3 - an interactive haplogroup classification and analysis platform’, *Nucleic Acids Research*, 51(W1), pp. W263–W268. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1093/nar/gkad284>.

Seidman, D.N. *et al.* (2020) ‘Rapid, phase-free detection of long identity-by-descent segments enables effective relationship classification’, *The*

American Journal of Human Genetics, 106(4), pp. 453–466. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2020.02.012>.

Simon, A. (2015) *FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data*. Beschikbaar via: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc> (bekeken op: 30 juni 2025).

Spyrou, M.A. *et al.* (2019) ‘Ancient pathogen genomics as an emerging tool for infectious disease research’, *Nature Reviews. Genetics*, 20(6), pp. 323–340. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0119-1>.

stschiff/sequenceTools (geen datum) *GitHub*. Beschikbaar via: <https://github.com/stschiff/sequenceTools> (bekeken op: 21 oktober 2024).

Sudlow, C. *et al.* (2015) ‘UK biobank: an open access resource for identifying the causes of a wide range of complex diseases of middle and old age’, *PLoS medicine*, 12(3), p. e1001779. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001779>.

Swali, P. *et al.* (2025) ‘Ancient *Borrelia* genomes document the evolutionary history of louse-borne relapsing fever’, *Science (New York, N.Y.)*, 388(6749), p. eadr2147. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1126/science.adr2147>.

Vanhoutte, S., Bradt, T., en Vandenbulcke, J. (2021) Beziect ende besmet metten lazars. *Tijd-Schrift*, 11: 6-23. Beschikbaar via: <https://histories.be/tijdschrift/ziekte/>

Weeda, C. (2022) ‘The Porous City: Dealing with Public Health Crises in Fifteenth-Century Sint-Truiden’, in C. Weeda, R. Stein, en L. Sicking (eds) *Comparative Rural History of the North Sea Area*. Turnhout, België: Brepols Publishers, pp. 99–120. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.1484/M.CORN-EB.5.129374>.

Wickham, H. (2007) ‘Reshaping Data with the reshape Package’, *Journal of Statistical Software*, 21, pp. 1–20. Beschikbaar via: <https://doi.org/10.18637/jss.v021.i12>.

Wickham, H. (2016) *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. 2de editie. Springer Publishing Company, Incorporated.

Wickham, H. *et al.* (2019) 'Welcome to the Tidyverse', *Journal of Open Source Software*, 4(43), p. 1686. Beschikbaar via:
<https://doi.org/10.21105/joss.01686>.

Protocol – oudDNA van pathogenen in Vlaams archeologisch onderzoek

Doel

Een kort en hanteerbaar stappenplan dat onderzoekers vanaf de vraagstelling tot en met de rapportering ondersteunt om verantwoord en efficiënt oudDNA van pathogenen te analyseren.

Doelgroep

De brede archeologische sector: erkende archeologen, fysisch antropologen, projectleiders, academici, depotbeheerders en erfgoedconsulenten.

1. Waarom pathogeen-oudDNA?

- Kernvragen: welke pathogenen zijn aanwezig (pest/lepra/hepatitis/tuberculose/...); wanneer en waar?
- Inzicht in gezondheid en ziekte in (post)middeleeuwse begravingen, leprozerieën, parochiekerkhoven en vergelijkbare sites in Vlaanderen.
- Vergelijkingen tussen sites, perioden en maatschappelijke groepen (bv. leprozerie vs. stadsparochie; abdijgemeenschap vs. dorpsbewoning; arbeiders vs. burgerij in de 19^{de} eeuw).

Stel bij aanvang duidelijke onderzoeksvragen. Voorbeelden:

- Komt pest (*Yersinia pestis*) voor in fase X (d.d. 14^{de}-16^{de} eeuw) op site Y?
- Is lepra (*Mycobacterium leprae*) aantoonbaar in een leprozerie-populatie?
- Zijn er co-infecties (bv. hepatitis B of parvovirus B19) in dezelfde populatie?
- Sluit de datering van positieve gevallen aan bij historische epidemieën?

2. Voorafgaand aan pathogeen-oudDNA

- Juridisch: regel akkoorden met opdrachtgever/eigenaar, erkend archeoloog, laboratorium en depot.

- Ethisch: motiveer selectie, minimaliseer destructie en respecteer waardige omgang (zie *Syntar 21*).
- Databeheer: leg eigenaarschap, opslag en publicatie van ruwe data vast.

3. Verloop van pathogeen-oudDNA analyse

- Sterk gefaseerde aanpak:
(a) staalname → (b) DNA-extractie → (c) aanmaak DNA-library → (d) pilootanalyse → (e) evaluatie mogelijke aanwezigheid pathogenen → (f) gerichte verrijking (*enrichment*) voor specifieke pathogenen.
- Stopregel: bij nuldetectie in de pilootanalyse wordt de bemonstering herzien (andere fasen/zones/targets) vóór opschaling.
- Het proces is langdurig en vereist een multidisciplinair team met (inter)nationale specialisten, aangezien elk type pathogeen eigen experts nodig heeft.

(a) Staalname

Door wie?

Fysisch antropologen of experts in oudDNA.

Waar en wanneer?

Bij voorkeur zo snel mogelijk na de opgraving, op een rustige locatie buiten de opgravingszone, zodat alle materialen grondig kunnen worden gereinigd om contaminatie te voorkomen (zie verderop). Het blijft ook zinvol dit onderzoek uit te voeren op eerder opgegraven menselijke resten in een depot.

Keuze stalen

- 1e keus: tanden (molaren M1–M2 met intacte apex of wortelpunt); hierbij beste kans op bloedgebonden pathogenen.
- 2e keus: rotsbeen; uitstekend voor menselijk DNA; zeer wisselend voor pathogenen.

Hygiëne & contaminatiebeheersing

- Draag FFP2/3-masker, haarnet, mouwbescherming en dubbele handschoenen om contaminatie met modern DNA te vermijden.

- Reinig gereedschap per staal met specifieke detergenten als ExitusPlus of DNA AWAY om DNA-sporen te verwijderen; werk op schone ondergrond.

Extractie

- Documenteer de tand vóór extractie via foto's, planlocaties, en beschrijvingen van tandplak en pathologieën).
- Trek de tand in één stuk; behoud de apex (wortelpunt).
- Bewaar elk staal in steriele buis/zak (dubbel), droog en koel, met contextcode, skeletpositie en datering/zone.

(b) DNA-extractie

Door wie?

Laborant die uitgebreid getraind is in het oudDNA-laboratorium (zoals ook in de volgende stappen).

Waar en wanneer?

Alleen in een gespecialiseerde extractieruimte van een oudDNA-laboratorium (zoals ook in de volgende stappen)

- Essentiële stap om het beperkte authentieke DNA steriel te verzamelen en op te zuiveren.

(c) Aanmaak van DNA library

- De DNA *library* bevat het totale DNA van een enkel staal: zowel endogeen (mens) als exogeen (bacterieel en viraal).
- De kwaliteitscontrole van deze *library* is cruciaal; dit materiaal wordt gebruikt voor de sequencing.

(d) Pilootanalyse

- *Shotgun* sequencing (laagdiep, 1–3M *reads*) om DNA-hoeveelheid en -kwaliteit in de *library* vast te stellen.

(e) Analyse

- Authenticiteit: controle van alle oudDNA-kenmerken waaronder fragmentlengte, schadeprofiel en controle van negatieven.
- Algemene screening op de aanwezigheid van pathogenen.
- Beoordeel het nut van verdere sequencing of verrijking.

(f) Gerichte verrijking

- *Capture* is een doelgerichte verrijking van een DNA-*library* met complementaire *probes*; na isolatie stijgt het aandeel *on-target reads* en de detectiekans.
- Pas *capture* enkel toe bij signaal in de pilootanalyse of sterk *a priori* bewijs.
- Plan 1–2 *captures* per vermoedelijk positief staal, steeds met negatieven en blanco's.
- Documenteer het *probe*-paneel (bron/ontwerp), *on-target* %, en de dekking (breedte/diepte).
- Deze fase gebeurt steeds in samenwerking met experts in de *capture* van het *target*-pathogeen.

4. Rapportering van pathogeen-DNA resultaten

- Staalregister (CSV): codes, context, materiaal, massa, foto/planlocatie.
- QA/QC-log: negatieven, replicaties, *batch*info.
- Analytisch rapport: methoden, authenticiteit, (sub)*lineages*/fylogenie, onzekerheden.
- Integratie: koppeling met stratigrafie, datering en fysisch antropologisch rapport.
- Data: FASTQ/BAM + metadata; publieke depositie pas na akkoord/publicatie.

5. Slaagkans van pathogeen-DNA

- Zeer variabele slaagkans.
- Tanden uit koele, droge contexten hebben beste kans op resultaat.

- Negatief resultaat wil niet zeggen dat het pathogeen afwezig was.
- Altijd combineren met uitgebreid en gespecialiseerd fysisch-antropologisch onderzoek.

6. Budget (excl. btw) van pathogeen-DNA studie

- Staalname/logistiek per individu: ca. €100
- DNA-extractie en *library* aanmaak per staal: ca. €200
- Pilootanalyse (*shotgun*) per staal: €200–€300
- *Hybrid capture* per *target*/staal: €500–€800
- Sequencing extra diepte per *target*/staal: ca. €300
- Bio-informatica (per *batch*): €2.000–€4.000

7. Veelgemaakte valkuilen & tips

- Als er geen negatieven/replicaties zijn van de analyses: twijfel aan authenticiteit van de resultaten.
- Alleen rotsbeen voor bloedpathogenen: verhoogde kans op vals-negatieven; kies bij voorkeur tanden die beter doorbloed zijn.
- Te krap budget zonder *capture*: leidt tot onderdetectie van het pathogeen.
- Geen vroege afstemming met het oudDNA-lab: vertragingen en extra kosten.
- Detecteerbaar zijn enkel DNA-pathogenen die in het bloed circuleren; RNA-virussen (zoals SARS-CoV-2) worden niet gedetecteerd.