

Genotypenfrequenzen und Vererbung im MNSs-System, zugleich ein Beitrag über die Verwendbarkeit der Merkmale S und s im Blutgruppentachten*

W. SPIELMANN, H. RUPPIN, L. SCHILLING und D. TEIXIDOR

Abteilung für Immunhämatologie und Transfusionskunde
der Universität Frankfurt a. M.

und dem Blutspendedienst des Deutschen Roten Kreuzes, Hessen
(Direktor: Prof. Dr. W. SPIELMANN)

Eingegangen am 20. Juli 1968

Im MNSs-System lassen sich die Vaterschaftsausschlüsse in drei Kategorien unterteilen, deren Zuverlässigkeitsgrad deutliche Unterschiede aufweist:

1. Die sog. Faktorenausschlüsse, bei denen eines der 4 Blutkörperchenmerkmale beim Kind vorhanden ist, jedoch bei der Mutter und dem als Vater in Anspruch genommenen Mann fehlt. Diese Ausschlüsse gelten mit Recht als besonders zuverlässig, da unter der Voraussetzung, daß die gleichen Testseren und Methoden bei allen Probanden verwendet werden, kaum mit Fehlerquellen zu rechnen ist (Theoretisch mögliche Ausnahmen: Suppressorgene, Mutationen).

2. Einfache Genotypenausschlüsse auf Grund einer entgegengesetzten Homozygotie der Merkmale M und N bzw. S und s ohne Berücksichtigung der Genkoppelungen. Hier ist infolge seltener Allele oder Defektvarianten mit zusätzlichen Fehlerquellen zu rechnen.

3. Genotypenausschlüsse unter Berücksichtigung der Genkoppelung, z. B. Kind NS/Ns, Kindsmutter MS/Ns, Eventual-Vater Ns/Ns. Hier kann der Genotyp der Mutter bisher nur durch die Untersuchung weiterer Familienangehöriger mit gewisser Wahrscheinlichkeit bestimmt werden. Diese Wahrscheinlichkeit läßt sich jedoch zur Zeit nicht genau festlegen, jedenfalls scheint ein „Crossing over“ häufiger vorzukommen als beispielsweise im Rhesus-System, und damit ist eine weitere, in ihrem Ausmaß schwer abzuschätzende Fehlerquelle gegeben [2, 14].

In dieser Arbeit wollen wir uns ausschließlich mit den unter 1 und 2 aufgeführten Arten des Vaterschaftsausschlusses beschäftigen und dabei insbesondere dem Allelenpaar S und s unsere Beachtung schenken. Die Sicherheit von Vaterschaftsausschlüssen hängt einerseits von der Zuver-

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

lässigkeit der Methodik und der verwendeten Testreagenzien, andererseits von der Sicherung des Erbganges ab.

Die meisten bisher vorliegenden Frequenzanalysen und Familienuntersuchungen sind ohne die Bestimmung des Merkmals *s* durchgeführt worden. Dies mag z. T. daran liegen, daß Anti-*s*-Seren schwerer erhältlich sind als Anti-*S*-Seren, und erst recht als Anti-*M* und Anti-*N*. Zum Teil aber liegt wohl die Ursache auch darin, daß die überwiegende Mehrzahl der bisher bekannten Anti-*s*-Testseren nur im Coombstest ausreichend zuverlässig reagiert, der vielen Untersuchern zu aufwendig und umständlich ist; hinzu kommt die zeitraubende Standardisierung der Anti-Human Globulin-Reagenzien mit dem jeweiligen Anti-*s*-Testserum. Die sichere Bestimmung der Homozygotie und damit die Ermöglichung von Vaterschaftsausschlüssen zweiter Art ist aber selbst durch eine exakte Bestimmung der Merkmale *S* und *s* nicht möglich, da man mit dem Vorkommen eines dritten, bisher stummen Allels am *S/s*-Locus rechnen muß. Die wenigen Autoren [1, 13], die *s*-Bestimmungen bei einem größeren Untersuchungsgut systematisch durchgeführt haben, konnten deshalb zu keinen zuverlässigen Aussagen über die Möglichkeit des Vorkommens weiterer Allele bzw. Defektvarianten am *S/s*-Locus kommen, da sie die Dosis bei den Phänotypen *S+s-* bzw. *S-s+* nicht bestimmt haben und damit den Genotyp nicht ermitteln konnten; denn der ohne Dosisuntersuchungen erkennbare Phänotyp *S-s-* sowie scheinbare Mutter/Kind-Inkompatibilitäten auf Grund mischerbiger seltener Allele sind nur bei einem sehr großen Untersuchungsgut zu erwarten, da ihre Frequenz bei der weißen Bevölkerung sehr gering ist [12].

Aus Deutschland wurde kürzlich auf der Tagung der Arbeitsgemeinschaft gerichtlicher Blutgruppengutachter in Würzburg über zwei solcher Mutter/Kind-Unverträglichkeiten berichtet. Einen dieser Fälle fand GERCHOW [3] bei einem Vaterschaftsgutachten, den anderen SPIELMANN [16] bei blutgruppenserologischen Studien an sog. sicheren Familien. Diesen Fall (Abb. 1) haben wir zum Anlaß genommen, die Nachweisbarkeit des dritten Allels am *S/s*-Locus mit Hilfe von Dosisuntersuchungen zu testen, um dann sowohl bei Frequenzanalysen als auch bei Familienuntersuchungen die gleiche Methodik anzuwenden. Derartige Untersuchungen erschienen uns auch deshalb von großer Bedeutung, da 1. eine frühere Frequenzanalyse recht unbefriedigende Übereinstimmungen zwischen Erwartungs- und Beobachtungswerten zeigte und 2. die Nachweisbarkeit des *s*-Merkmals in Abhängigkeit von Alter und Lagerungsbedingungen der zu untersuchenden Blutkörperchen unter Verwendung einiger Testseren große Schwankungen aufwies, obgleich diese Seren den Mindestanforderungen der Richtlinien durchaus entsprachen (Spezifität und Mindesttiter gegen Erythrozyten heterozygoter Merkmalsträger über 1:8). Damit in Zusammenhang stehen mag eine dritte Beobachtung, die uns

zur Zurückhaltung der Verwertung von s-Befunden im Gutachten bewog, nämlich das diskordante Verhalten einiger eingeschickter Blutproben mit einer größeren Anzahl verschiedener Anti-s-Seren.

Im folgenden soll daher über zwei zu verschiedenen Zeiten durchgeführte Untersuchungsreihen zur Bestimmung der kompletten MNSs-Phänotypen¹ und Genfrequenzen im MNSs-System berichtet werden, nachdem die Methodik und die Vorversuche zur Ermittlung der Sicherheit von Dosisuntersuchungen beschrieben sind. Außer der einen, oben

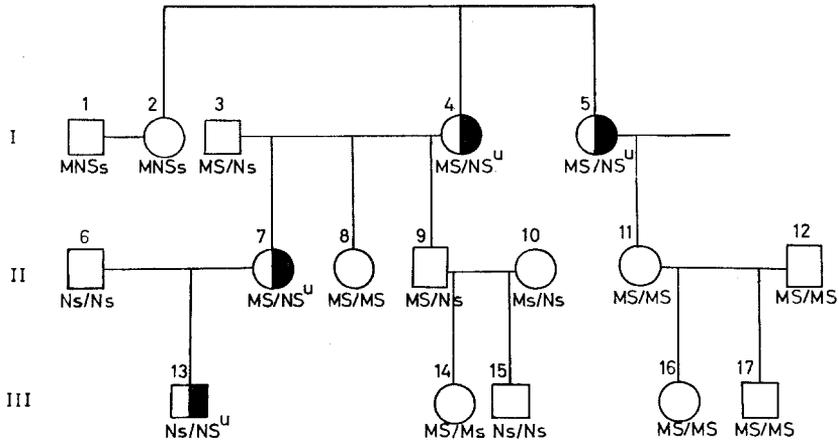


Abb. 1. Die Vererbung von S^u in 3 Generationen einer hessischen Familie

angeführten Familie aus Hessen mit einem seltenen Allel am S/s-Locus haben wir während der Versuchsserien häufig Negerblutproben mit verschiedenen S^u-haltigen Genotypen zu Kontrollen verwenden können. Weiterhin werden zur Sicherung des Erbanges erstmals komplette Phänotypenbestimmungen bei einer größeren Zahl von Familien (303) mitgeteilt.

Methodik und Vorversuche

Als Anti-M und Anti-N-Testseren wählten wir besonders starke handelsübliche Testseren vom Kaninchen für unsere Untersuchungen aus. Um die schwachen Allele von M und N mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit erkennen zu können, untersuchten wir alle Proben mit mindestens je 2 Testseren. Die Anti-M-Seren enthielten eine ausreichend starke Anti-Mg-Quote, so daß beim Genotyp MgN zumindest eine abgeschwächte Reaktion mit den Anti-M-Seren zu erwarten gewesen wäre. Reine Anti-Mg-Seren standen uns nur in geringer Menge zur Verfügung, so daß wir im

¹ Unter „kompletten Phänotypen“ im MNSs-System verstehen wir die Untersuchung auf die genannten 4 Merkmale unter zusätzlicher Berücksichtigung der Zygotität der Faktoren M und N einerseits sowie S und s andererseits. Außer bei der Gruppe MNSs ergibt sich nach dieser Definition aus dem kompletten Phänotyp immer eindeutig der Genotyp.

Rahmen der Frequenzanalysen nur 164 M-Blutproben damit testen konnten, um mischerbige MMg-Proben zu erfassen. Alle diese Blutproben reagierten jedoch negativ. Für die MN-Bestimmungen wandten wir grundsätzlich den Plattentest an, und zwar unter Inkubation von 10 min bei Zimmertemperatur.

Zur Bestimmung der Merkmale S und s verfügten wir über insgesamt 8 Anti-S- und 9 Anti-s-Testseren, die alle spezifisch mit einem Titer von mindestens 1:16 gegen Erythrozyten jeweils heterozygoter Merkmalsträger anzeigten. Die Anti-s-Seren reagierten ausnahmslos nur im Anti-Human-Globulintest. Sowohl die Bestimmung von S als auch von s wurde im Röhrchentest durchgeführt, die Inkubation betrug 45 min, für S bei 22°C und für s bei 37°C. Vor der Ablesung, die makroskopisch erfolgte, wurden die Röhrchen 1 min bei 500 U/min zentrifugiert. Weiterhin verfügten wir über eine kleine Menge Anti-U-Serum, das jedoch auch mit Blutproben vom Phänotyp S—s— schwach anzeigte. Diese letzteren stammten ausnahmslos von Negern. Da diese Ergebnisse schwer zu deuten sind, bleiben sie im folgenden unberücksichtigt.

Bei den Titrationen zur Ermittlung des Dosiseffektes verwendeten wir die übliche Verdünnungsreihe mit physiologischer Kochsalzlösung als Verdünnungsmittel. Die Inkubationszeiten und -temperaturen sowie die Dauer und Stärke der Zentrifugation waren recht unterschiedlich. Da es zu weit führen würde, sämtliche Vorversuche wiederzugeben, sollen in den Tab. 1 u. 2 nur diejenigen Versuche aufgeführt werden, die zur Ermittlung des für den Dosistest jeweils optimal geeigneten Anti-S- sowie Anti-s-Serums führten. Als optimale Technik sehen wir diejenige an, die mit den heterozygoten Testerythrozyten gerade eine Spur einer Agglutination bei mikroskopischer Ablesung zeigt, makroskopisch höchstens jedoch ein zweifelhaftes (\pm) Ergebnis liefert. Dies ist bei dem Anti-S-Serum die Inkubation von 120 min bei 37°C unter Zentrifugation von 1 min bei 3000 U/min und bei dem s-Serum eine Inkubation von 30 min bei 37°C und einer Zentrifugation von 1 min bei 1000 U/min. Bei unserem Score-System kommt der kompletten Agglutination (++++) die Kennziffer 10 zu, die sehr starke grobschollige Agglutination (+++) hat die Kennziffer 8 usw. Zwischen 0 und 10 können alle ganzen Zahlen als Kennziffern vorkommen. Die Abb. 2 u. 3 lassen erkennen, daß Überschneidungen der Scorewerte von Blutproben homozygoter und heterozygoter Merkmalsträger nicht vorkommen. Etwaige Fehlbestimmungen würden außerhalb des 3-Sigmabereiches liegen.

Vom mathematischen Standpunkt ist die Berechnung des Mittelwertes bei den Reaktionen der Blutproben heterozygoter Merkmalsträger in der üblichen Form insofern anfechtbar, als dieser nicht das Maximum der Gaußschen Verteilungskurve wiedergibt. Um den schwierigen, sog. Randproblemen aus dem Wege zu gehen, haben wir jedoch zur Berechnung der 3-Sigmagrenzen den Mittelwert nach dem herkömmlichen Verfahren berechnet. Auf diese Weise wird der Abstand (Leerbereich) zwischen den 3-Sigmabereichen der beiden Gruppen etwas geringer und damit erscheinen die Dosisergebnisse ungünstiger, als es der Wirklichkeit entspricht.

Weitere Vorversuche erschienen uns im Hinblick auf die Nachweisbarkeit des s-Merkmals an unter verschiedenen Bedingungen gelagerten Blutkörperchen aus folgenden Gründen angebracht:

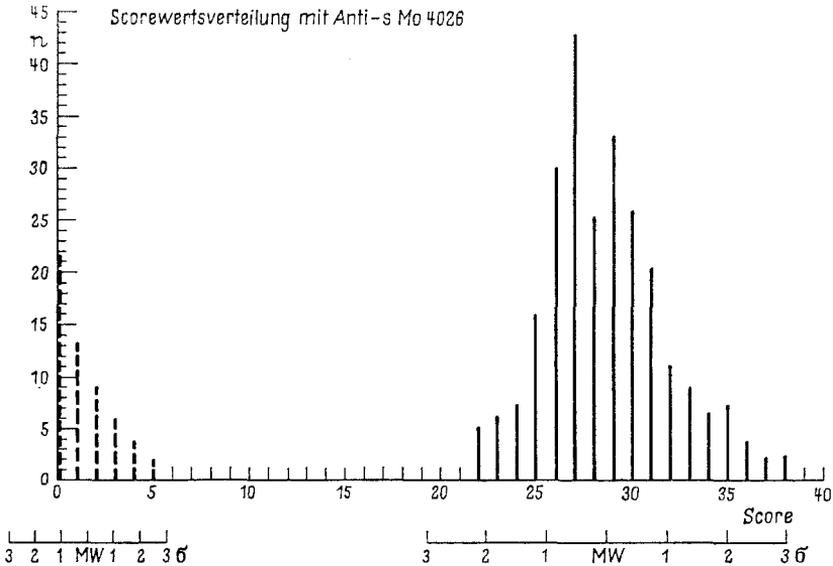
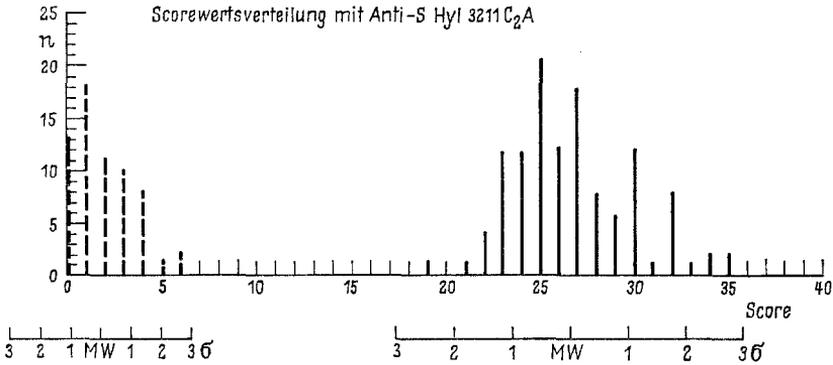
1. Bei einer früheren, nicht publizierten Frequenzanalyse an 1425 Blutproben von freiwilligen Blutspendern aus Hessen stimmten die Erwartungs- und Beobachtungswerte nur schlecht überein ($p \sim 0,02$ bei 8 F. G.): Während sowohl bei M und N als auch bei S die Phänotypen eine recht gute Übereinstimmung zeigten, fanden wir zu viel SS- und zu wenig Ss-Typen. Wahrscheinlich sind also einige heterozygot vorliegende s-Merkmale nicht erkannt worden. Dosisuntersuchungen wurden bei dieser Versuchsserie nicht durchgeführt.

Tabelle 1. Dosisreaktionen mit Ani-S (*Hyl 3211C2A*)

Zentrifugation 30 sec bei 500 U/min				Zentrifugation 1 min bei 3000 U/min							
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
15 min bei 4°C											
Ss	+	-	-	-	-	Inkubation wie links	(+)	-	-	-	-
SS	+	+	(+)	-	-	Ss	+	+	(+)	-	-
						SS	+	+	(+)	±	-
15 min bei 22°C											
Ss	(+)	-	-	-	-	Inkubation wie links	(+)	-	-	-	-
SS	+	(+)	±	-	-	Ss	+	+	(+)	±	-
						SS	+	+	(+)	±	-
15 min bei 37°C											
Ss	-	-	-	-	-	Inkubation wie links	-	-	-	-	-
SS	+	+	±	-	-	Ss	+	+	(+)	±	-
						SS	+	+	(+)	±	-
120 min bei 37°C											
Ss	-	-	-	-	-	Inkubation wie links	-	-	-	-	-
SS	+	+	+	(+)	-	Ss	±	+	+	+	±
						SS	+	+	+	+	±

Tabelle 2. Dosisreaktionen mit Anti-s (Mo 4026)

	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
15 min bei 4°C; ohne Zentrifugation													
Ss	+	(+)	±	-	-	-		+	+	(+)	±	-	-
ss	+	+	+	±	-	-		+	+	+	+	±	-
15 min bei 37°C; 30 sec bei 500 U/min													
Ss	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-
ss	+	+	(+)	±	-	-		+	+	+	(+)	±	-
30 min bei 37°C; 30 sec bei 500 U/min													
Ss	±	-	-	-	-	-		±	-	-	-	-	-
ss	+	+	+	+	(+)	-		+	+	+	+	+	±
60 min bei 37°C; 30 sec bei 500 U/min													
Ss	(+)	±	-	-	-	-		+	+	+	±	-	-
ss	+	+	+	+	+	(+)		+	+	+	+	+	(+)
15 min bei 22°C; 30 sec bei 500 U/min													
Ss	+	+	+	+	±	-		+	+	(+)	±	-	-
ss	+	+	+	+	+	-		+	+	+	+	±	-
15 min bei 37°C; 1 min bei 1000 U/min													
Ss	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-
ss	+	+	+	+	+	-		+	+	+	(+)	±	-
30 min bei 37°C; 1 min bei 1000 U/min													
Ss	±	-	-	-	-	-		±	-	-	-	-	-
ss	+	+	+	+	(+)	-		+	+	+	+	+	±
15 min bei 37°C; 1 min bei 3000 U/min													
Ss	+	+	-	-	-	-		+	+	(+)	±	-	-
ss	+	+	+	+	+	(+)		+	+	+	+	+	(+)



2. Bei einer Mutter/Kind-Kombination, deren Blutproben wir zugeschiedt erhielten², zeigte das Kind nur mit 3 von 9 Anti-s-Testseren positiv an, während das S-Merkmal normal ausgeprägt war. Der Dosistest ergab nur die einfache Dosis für S. Die Kindsmutter dagegen war eindeutig ss. Bei der s-Bestimmung des Kindes fiel auf, daß speziell diejenigen Anti-s-Seren deutlich positiv (+++) anzeigten, die mit der heterozygoten Kontrolle eine +++-Reaktion ergaben. Die Titer waren bei diesen 3 Seren besonders hoch (über 1:128), jedoch ergaben auch die übrigen 6 Seren meistens ++-Reaktionen mit den heterozygoten Kontrollen (nur in 1 Fall eine +-Reaktion) und in jedem Fall lag der Titer über 1:8.

² Wir danken Herrn Dr. SCHRIEVER, Dortmund, für die Übersendung dieser Blutproben.

Um zu prüfen, ob derartige schwache s-Antigene häufiger vorkommen bzw. ob eine derartige Abschwächung nur als Folge einer längeren oder unsachgemäßen Lagerung auftritt, haben wir u. a. 60 beliebige Ss-Blutproben im frischen Zustand, nach 1—2tägiger Lagerung bei 4°C sowie nach 3wöchentlicher Lagerung bei 4°C untersucht und dabei festgestellt, daß mit einigen Seren nach 1—2tägiger Lagerung das s-Merkmal am sichersten nachgewiesen werden kann; die Reaktionen betragen im Durchschnitt +++ bis ++++. Im frischen Zustand sowie bei einer längeren Lagerung als 8 Tage, besonders ausgeprägt allerdings nach 3 Wochen, waren die Reaktionen abgeschwächt; 20% der Proben reagierte nach 3 Wochen nur noch ± bzw. (+). Dies sind derart schwache Reaktionen, daß man sie in der Routine leicht übersehen und die Blutprobe als s-negativ fehldiagnostizieren kann. Nach 8tägiger Lagerung bei 4°C war die Abschwächung nicht signifikant, wohl aber schon nach 3tägiger Aufbewahrung bei erhöhter Zimmertemperatur (24—25°C). Die Aufschwemmungen stellten wir jeweils unmittelbar vor Ansetzen des Versuchs aus den geronnenen Blutproben her.

Es war uns also möglich, sowohl eine Erklärung für die frühere unzulängliche Frequenzanalyse zu finden, als auch die Verhältnisse bei dem o. a. Mutter/Kind-Fall zu imitieren, obgleich damit keineswegs bewiesen ist, daß nach dem Eintreffen des Untersuchungsmaterials eine derartige Abschwächung infolge der Lagerung oder auf dem Transport eingetreten war. Vielmehr ist die Möglichkeit eines schwachen s-Allels, das im Dosisphänomen nicht eindeutig erkennbar ist, nicht auszuschließen. Bei S wurde eine solche schwach anzeigende Variante S₂ von HURD u. Mitarb. [5] beschrieben.

Zur Vermeidung obiger Lagerungsdefekte haben wir in den nachstehend beschriebenen Frequenzanalysen mindestens eins der drei starken Anti-s-Seren verwendet, die sowohl mit den abnorm anzeigenden eingesandten kindlichen Blutproben als auch mit den 3 Wochen gelagerten Blutproben noch eindeutig positiv reagierten. Außerdem haben wir darauf geachtet, daß nur solche Blutproben untersucht wurden, die nicht älter als 1 Woche waren und bei denen die Kühlkette nicht durch Manipulationen an den Stämmröhrchen, die einen längeren Aufenthalt bei Zimmertemperatur erforderlich machten, unterbrochen war. Dagegen konnten bei den Familienblutproben, die z. T. mit der Post eingesandt wurden, diese strengen Bedingungen nicht immer eingehalten werden (s. Seite 198).

Ergebnisse

Um eine evtl. mögliche Auswirkung der oben beschriebenen Fehlerquellen zu erkennen, haben bei den Frequenzanalysen zunächst zwei verschiedene Untersucher, die mit unterschiedlichen Testseren unabhängig voneinander arbeiteten, bei jeweils über 1000 Blutproben von freiwilligen Blutspendern aus Hessen die Merkmale M, N, S und s bestimmt und sowohl bei den Phänotypen S+s— als auch S—s+ die entsprechenden Titrationen zur Auswertung des Dosiseffektes angesetzt (Tabelle 3 u. 4). Jeder Untersucher hat für sich nach den von MOURANT [11] angegebenen Formeln die Genfrequenzen ermittelt. Es zeigte sich in beiden Kollektiven eine gute Übereinstimmung zwischen Erwartungs- und Beobachtungswerten ($p > 0,95$) außerdem stimmten die aus den verschiedenen Kollektiven ermittelten Genfrequenzen befriedigend überein. Fehlerquellen auf Grund der Verwendung unterschiedlicher Testseren oder individueller Eigenarten bei der Ablesung sind somit auszuschließen und beide Kollektive können

Tabelle 3. *Frequenzanalyse im MNSs-System (Gruppe I)*
(nicht verwandte Personen aus Hessen)

	Beobachtet	Erwartet	X^2
MSS	93	87,85	0,3019
MSs	197	207,85	0,5664
Mss	128	122,95	0,2074
MNSS	49	55,03	0,6607
MNSs	350	352,52	0,0180
MNss	350	340,04	0,2917
NSS	8	8,62	0,0446
NSs	91	90,03	0,0105
Nss	234	235,10	0,0051
	1500	1499,99	2,1063

$p \sim 0,98$ (8 F. G.).

$M = 0,5283$; $N = 0,4717$; $S = 0,3127$; $s = 0,6873$; $MS = 0,2420$; $NS = 0,0758$;
 $Ms = 0,2863$; $Ns = 0,3959$.

Tabelle 4. *Frequenzanalyse im MNSs-System (Gruppe II)*
(nicht verwandte Personen aus Hessen)

	Beobachtet	Erwartet	X^2
MSS	66	64,91	0,0183
MSs	154	157,11	0,0616
Mss	96	95,06	0,0093
MNSS	36	36,18	0,0009
MNSs	234	238,32	0,0738
MNss	242	235,41	0,1845
NSS	5	5,04	0,0003
NSs	54	54,22	0,0009
Nss	145	145,74	0,0038
	1032	1031,99	0,3534

$p > 0,99$ (8 F. G.).

$M = 0,5543$; $N = 0,4457$; $S = 0,3178$; $s = 0,6822$; $MS = 0,2508$; $NS = 0,0699$;
 $Ms = 0,3035$; $Ns = 0,3758$.

zusammengefaßt werden (Tabelle 5), um die Genfrequenzen bei der hessischen Bevölkerung möglichst exakt zu ermitteln.

Obwohl bei allen bezüglich S und s homozygoten Proben der Dosisversuch durchgeführt wurde (in den Abb. 1 u. 2 ist nur ein Teil der Dosis-tests aufgeführt, soweit sie mit dem gleichen Testserum angesetzt wurden), ergab sich bei keinem homozygoten Blut die einfache Dosis und damit ein Hinweis für ein drittes Allel, das wir der Einfachheit halber mit S^u bezeichnen wollen, obgleich die Identität mit dem S^u der Negriden, wie es von WIENER [17] ursprünglich beschrieben worden ist, keineswegs bewiesen ist. Serologisch verhalten sich die S^u -Proben aus der in der Einleitung beschriebenen hessischen Familie genauso wie die bei Negriden

Tabelle 5. *Frequenzanalyse im MNSs-System (Gruppe I + II)
(nicht verwandte Personen aus Hessen)*

	Beobachtet	Erwartet	χ^2
MSS	159	152,72	0,2587
MSs	351	364,78	0,5206
Mss	224	217,83	0,1747
MNSS	85	91,30	0,4346
MNSs	584	591,19	0,0875
MNss	592	575,84	0,4536
NSS	13	13,65	0,0305
NSs	145	144,13	0,0053
Nss	379	380,55	0,0063
	2532	2531,99	1,9718

$p \sim 0,98$ (8 F. G.).

M = 0,5389; N = 0,4611; S = 0,3148; s = 0,6852; MS = 0,2456; NS = 0,0734;
Ms = 0,2933; Ns = 0,3877.

Tabelle 6. *Frequenzanalyse bei 484 Negern aus dem Süden von Mocambique*

	Beobachtet	Erwartet	χ^2
MSS	8	5,63	0,9977
MSS ^u	3	1,73	0,9323
MSs	33	39,87	1,1838
Mss	73	70,52	0,0872
MsS ^u	5	6,13	0,2083
MS ^u S ^u	0	0,13	—
MNSS	13	9,12	1,6507
MNSS ^u	4	5,62	0,4670
MNSs	56	70,49	2,9786
MNss	152	135,27	2,0691
MNsS ^u	20	20,81	0,0315
MNS ^u S ^u	1	0,65	—
NSS	5	3,69	0,4651
NSS ^u	5	3,41	0,7414
NSs	26	30,94	0,7887
Nss	67	64,87	0,0699
NsS ^u	12	14,32	0,3759
NS ^u S ^u	1	0,79	0,1178 ^a
	484	483,99	13,1650

$p \sim 0,60$ (15 F. G.)

Genfrequenzen: M = 0,5062; N = 0,4938; S = 0,1849; s = 0,7603; S^u = 0,0548;
NS^u = 0,0404; MS = 0,1079; NS = 0,0873; Ms = 0,3817; Ns = 0,3661; MS^u = 0,0166.

^a Dieser χ^2 -Wert ergibt sich durch die Zusammenfassung der Erwartungs- und Beobachtungswerte der Phänotypen MS^uS^u, MNS^uS^u, NS^uS^u.

vorkommenden S^u-Merkmale. Dies soll an einer Studie von 484 Negern aus dem Süden von Mocambique erläutert werden (Tabelle 6). Die Unterteilung nach Rassen, auf die an anderer Stelle eingegangen ist [9] wurde

hier nicht vorgenommen, zumal die Unterschiede in den Blutgruppen nicht ins Gewicht fallen. (85 Personen des nördlich des Sambesinflusses lebenden Sena-Stamms, der deutliche rassische Unterschiede zu allen übrigen Stämmen aufweist, bleiben in dieser Aufstellung unberücksichtigt.) In diesem Zusammenhang möchten wir vor allem darauf hinweisen, daß die durch Dosisuntersuchungen in der beschriebenen Technik ermittelten Genotypenfrequenzen für mischerbige S^u -Personen mit den Erwartungswerten in allen Genotypen recht gut übereinstimmen. Die Genfrequenzen wurden nach MOURANT [11] für MS und Ms gesondert berechnet und aus der Differenz $M - (MS + Ms)$ die Frequenz für MS^u ermittelt. Analog gingen wir zur Berechnung von NS^u vor. Da die Untersuchung der Neger-Blutproben in gleichen Zeiträumen stattfand wie die Untersuchung bei der weißen Bevölkerung, hatten wir außer den heterozygoten Ss-Kontrollen laufend mischerbige S^u -Proben zur Verfügung, insgesamt 12 SS^u , 37 sS^u .

Es sei bemerkt, daß wir — abgesehen von der eingangs erwähnten Sippe — bei keiner Blutprobe aus der weißen Bevölkerung eine auffallend schwache Reaktion mit einem der Testseren gesehen haben. Hinweise auf Defektvarianten, wie z. B. das D^u im Rh-System, ergaben sich also nicht.

Nur in einem einzigen Fall sahen wir bei einem MsMs Probanden eine einfache Dosis von s und mußten damit den Genotyp Ms MS^u annehmen. Nachforschungen über die Identität des Spenders ergaben jedoch, daß es sich zufällig um einen Farbigen der amerikanischen Besatzungsmacht gehandelt hat. Daraufhin haben wir alle Spendetermine, von denen wir Untersuchungsmaterial für diese Frequenzanalysen entnommen haben, überprüft und festgestellt, daß bei den übrigen in dieser Statistik enthaltenen Personen keine farbigen oder fremdrassischen Personen enthalten waren. Desgleichen haben wir auch Gastarbeiter, die übrigens im Vergleich zu ihrer Anzahl recht selten zur freiwilligen Blutspende kommen, aus dieser Statistik ausgeschlossen, soweit es an Namen und Vornamen erkennbar war.

Bei den auf Seite 196 und 197 aufgeführten 303 Familienuntersuchungen (Tabelle 7) sind zur Berechnung der Erwartungswerte die aus der vorigen Massenstatistik von 2532 Personen gewonnenen Genfrequenzen zugrunde gelegt. Wenn sich auch im Durchschnitt eine befriedigende Übereinstimmung zwischen Erwartungs- und Beobachtungswerten bei den einzelnen Paarungen ergibt, so könnte sich doch auf Grund der Diskrepanzen bei einigen Paarungen mit mehrfachem Vorkommen der Genkomplexe MS bzw. NS (Gruppe 1, 12 und 27) der Verdacht ergeben, daß einige s-Antigene nicht erfaßt wurden; denn hier wurden die Blutproben nicht immer unter den gleichen strengen Bedingungen gehalten wie bei den Frequenzanalysen. Gegen diesen Verdacht spricht aber nicht nur die relativ kleine Anzahl von Paarungen in den betreffenden Gruppen sondern noch mehr die Tatsache, daß die kompletten Phänotypen der Kinder in keinem Fall einen Hinweis gegen die Richtigkeit der Erbregeln bzw. der Befunde bei den Eltern ergeben. Im Gegenteil stimmen auch bei den Kindern durchschnittlich Erwartungs- und Beobachtungswerte gut überein.

Besprechung der Ergebnisse

Die Genotypenfrequenzen im MNSs-System, die, soweit sie aus dem europäischen Raum stammen, in Tabelle 8 zusammengestellt sind, zeigen keine wesentlichen Unterschiede. Für die Berechnung der Ausschlußwahrscheinlichkeiten und die Verwendung der Essen-Möller-Formel zur Berechnung der Vaterschafts-, „Wahrscheinlichkeit“ dürften diese Unterschiede nicht bedeutsam sein, wohl aber für Frequenzanalysen, bei denen es nicht zulässig ist, die Ergebnisse anderer Autoren mitzubenutzen.

Tabelle 8. *MNSs-Genotypenfrequenzen in Europa*

Genotyp	RACE u. SANGER [13] Engländer	CLEGHORN [1] Engländer	KULICH [7] Tschechen	Eigene Ergebnisse Deutsche (Hessen)
MS/MS	6,1094	5,6516	4,382	6,2796
MS/Ms	13,9964	14,4906	15,936	13,8626
Ms/Ms	8,0163	9,2885	8,765	8,8468
MS/NS	3,9650	3,3411	3,187	3,3570
MS/Ns	23,7961	22,6944	21,315	23,0648
Ms/NS	22,0553	23,6032	25,299	23,3807
NS/NS	0,6433	0,4938	0,598	0,5134
NS/Ns	6,2480	5,4421	6,175	5,7267
Ns/Ns	15,1702	14,9947	14,343	14,9684
Zahl der Personen	1419	1000	502	2532

In unserem Familiengut, das vom Personal der Universitäts-Kliniken und -Institute sowie von freiwilligen Blutspendern aus Hessen stammte, wurden grundsätzlich auch die übrigen im gerichtlichen Gutachten anerkannten Merkmale untersucht sowie zusätzlich das komplette Duffy-, Kidd- und Lutheran-System. 3 Familien mußten ausgeschlossen werden, da eines der Kinder offenbar nicht von den betreffenden Eheleuten abstammen konnte; jedoch fanden wir in diesem Untersuchungsgut keinen isolierten Ausschluß auf Grund einer entgegengesetzten Homozygotie der Merkmale S und s.

Bei allen s-Bestimmungen sind folgende technische Vorbedingungen zu beachten:

a) Die Blutproben sollten relativ frisch, jedoch möglichst 24 Std im Kühlschrank gelagert sein. Erfolgt die Untersuchung zu einem späteren Zeitpunkt, so sollte die Kühlkette zwischenzeitlich nicht unterbrochen werden. Ein Postversand unmittelbar nach der Entnahme scheint im Regelfall (weniger als 3 Tage bis zur Untersuchung bzw. Kühllhaltung, Temperatur unter 20°C) die Ergebnisse nicht zu beeinträchtigen. Die

Erythrocytenaufschwemmungen müssen unmittelbar vor dem Test frisch angesetzt werden.

b) Die Testseren, insbesondere die Anti-s-Seren, müssen im qualitativen Test zu einer kompletten oder fast kompletten Agglutination auch bei heterozygoten Merkmalsträgern führen. Ein Titer von 1:8 reicht als Mindestanforderung an die Empfindlichkeit bei Anti-s-Reagentien für sich allein nicht aus. In Ausschlußfällen kann die Zahl der Reagentien nicht groß genug sein; jedenfalls sind in Zweifelsfällen (Homozygotie-Ausschlüsse) zur sicheren Bestimmung des s-Merkmals zwei Seren zu wenig.

c) Bei allen Ausschlüssen auf Grund einer entgegengesetzten Homozygotie ist zum Ausschluß eines dritten Allels (S^u) eine Dosisuntersuchung zu empfehlen, wobei eine entsprechende Standardisierung der Testreagentien notwendig ist, so lange derartige Testseren nicht handelsüblich mit einer entsprechenden, vorher ausgearbeiteten Vorschrift geliefert werden. Die in den Richtlinien zur Sicherung solcher Ausschlüsse geforderte Titration, die anstelle der früher geforderten Absorption getreten ist, liefert ohne nähere Hinweise über die notwendige Standardisierung sowie die jeweils mitzuführenden Kontrollen keine ausreichende Sicherung der Genotypen.

Auch bei Beachtung dieser Empfehlungen würden wir bei isolierten Ausschlüssen auf Grund einer entgegengesetzten Homozygotie der Merkmale S und s über die Beurteilung „Vaterschaft sehr unwahrscheinlich“ nicht hinausgehen, eine Vorsichtsmaßnahme, die sich übrigens nach neueren Erkenntnissen auch im Rhesus-System bei den Merkmalen C/c sowie E/e empfiehlt. Sogar im ABO-System ist eine gewisse Zurückhaltung angezeigt, nachdem in den letzten Jahren 7 Familien gefunden wurden, bei denen offenbar die Gene A und B auf dem gleichen Chromosom lokalisiert sind und somit gemeinsam vererbt werden („reisen“) [8, 10, 15, 18—20]. Auf diese Weise werden auch früher gelegentlich beobachtete AB/0-Mutter-Kind-Konstellationen [4, 6] von MADSEN und HEISTÖ [8] gedeutet. Insbesondere aber bei den neu eingeführten Blutgruppenmerkmalen sollte der Sachverständige den Mut haben, in Zweifelsfällen von der Verwendung eines Befundes im Gutachten abzusehen, falls die erforderlichen zusätzlichen Untersuchungen zur Bestätigung und Sicherung der Ergebnisse nicht durchgeführt werden können.

Zusammenfassung

Die Bestimmung der Antigene des MNSS-Systems, insbesondere die s-Bestimmung, ist mit gewissen Unsicherheitsfaktoren belastet, die sich bei Frequenzanalysen, Familienuntersuchungen und Vaterschaftsgutachten auswirken können. Voraussetzung zur sicheren Bestimmung des s-Merkmals ist einerseits die Verwendung mehrerer geeigneter Testseren, wobei

außer dem Mindesttiter eine kräftige Reaktion (+++ bis ++++) in der ersten und zweiten Stufe zu fordern ist und andererseits die Vermeidung von Schädigungen der zu untersuchenden Blutproben durch Lagerung oder Erwärmung, die sich bei der s-Bestimmung in stärkerem Grade auswirken, als bei der Bestimmung vieler anderer Antigene.

Weitere, allerdings bei der weißen Bevölkerung sehr seltene Fehlerquellen, die sich nur bei Ausschlüssen auf Grund entgegengesetzter Homozygotie der Merkmale S und s auswirken, sind die Antigenabschwächungen von s und das Vorkommen eines oder mehrerer weiterer Allele am S/s-Locus. Diese Fehlerquellen können durch geeignete Dosisuntersuchungen ausgeschaltet werden, da nach den bisher vorliegenden Erfahrungen seltene Allele sich in Verbindung sowohl mit S als auch mit s durch die einfache Dosis zu erkennen geben, ähnlich wie die heterozygoten Ss-Typen. Die Fehlerbreite liegt außerhalb des 3-Sigma-Bereiches. Mischerbige S^u-Typen fanden wir bei der weißen Bevölkerung nur in einer Großfamilie, dagegen 49mal bei Negern, bei denen sich das S^u in der Titration gleichartig wie bei 4 Personen dieser weißen Sippe verhielt.

Die Genfrequenzen wurden aus einem Kollektiv von 2532 Personen der hessischen Bevölkerung und aus einem Kollektiv von 484 Farbigen aus dem südlichen Mocambique berechnet. Die daraus ermittelten Erwartungswerte für die Genotypenfrequenzen stimmen mit den gefundenen Werten recht gut überein.

Bei 303 unausgewählten Familien aus Hessen mit insgesamt 606 Kindern wurde kein Widerspruch gegen die Erbregeln gefunden.

Insgesamt berechtigen diese Befunde zu der Schlußfolgerung, daß sowohl ein drittes Allel am S/s-Locus, als auch abgeschwächte S- bzw. s-Varianten bei der hessischen Bevölkerung extrem selten vorkommen. Auch das Mg-Gen ist relativ selten; es wurde von uns bisher nicht gefunden. Dennoch ist bei Vaterschaftsgutachten diesen Möglichkeiten Rechnung zu tragen, wenn auch die meisten bisher bekannt gewordenen Anomalien im MNSs-System auf technischen Unzulänglichkeiten beruhen. Über die Aussage „Vaterschaft sehr unwahrscheinlich“ sollte man derzeit bei Vaterschaftsausschlüssen auf Grund einer entgegengesetzten Homozygotie nicht hinausgehen.

Summary

The determination of the antigens in the MNSs-system, preferably of s, is connected with several sources of errors which may be of importance in frequency and family studies as well as in medicolegal work. For s-testing several suitable anti-s sera which give strong reactions (+++ or ++++) with heterozygous control cells should be used and red cell damages by storage or heating during transport which influence

the results to a greater extent than in most the other antigens should be strictly avoided.

Further sources of errors, rare occurring in the white population and only influencing paternity exclusions based on opposite homozygosity of the alleles S and s, are weakened s-antigens and a third allele on the S/s-locus. The latter possibility may be recognized by dosage tests, since rare alleles only give a single dosis of S, resp. s, similar as the heterozygous Ss-types. The two distribution curves of scores differ more than the threefold standard deviation. Heterozygous S^u-types were found only 4 times in our studies on white persons in a single Hessian family, but 49 times in 484 Bantu-negroes.

Gene frequencies were calculated from a collective of 2532 unrelated persons of Hessia and of 484 negroes living in southern Mocambique. The calculated genotype values are in a good agreement with the observed values.

Complete MNSs-phenotyping in 303 unselected families with 606 children showed no case of contradiction against the hereditary rules.

Literatur

1. CLEGHORN, T. E.: MNSs gene frequencies in English blood donors. *Nature (Lond.)* **187**, 701 (1960).
2. GEDDA-DAHL, T., A. L. GRIMSTADT, S. GUNDERSEN, and E. VOGT: A probable crossing-over or mutation in the MNSs blood group system. *Acta genet. (Basel)* **17**, 193—210 (1967).
3. GERCHOW, J.: Vortr. Tgg. gerichtl. Blutgruppensachverst., Würzburg 1967.
4. HASELHORST, G. u. A. LAUER: Über eine Blutgruppenkombination Mutter AB und Kind O. *Z. Konstitiologie* **15**, 205—228 (1930).
5. HURD, J. K., R. F. JACOX, S. N. SWISHER, T. E. CLEGHORN, S. CARLIN, and F. H. ALLEN: S₂, a new phenotype in the MN blood group system. *Vox Sang. (Basel)* **9**, 487 (1964).
6. KOSOVITCH, N.: Les groupes sanguins chez les français et les règles de l'hérédité. *Rev. anthrop.* **39**, 374—379 (1929).
7. KULICH, VI.: Frequenz der Gene MNSs bei Blutspendern im Kreise Pilsen. *Blut* **10**, 368—370 (1964).
8. MADSEN G. and H. HEISTÖ: A Korean family showing inheritance of A and B on the same chromosome. *Vox Sang. (Basel)* **14**, 211—217 (1968).
9. MATZNETTER, T., u. W. SPIELMANN: Blutgruppen mocambiquanischer Bantustämme. *Z. Morph. u. Anthrop.* 1968 (im Druck).
10. MOULLEC, J., and P. LECHÉVREL: A rare variant of B in a human blood sample belonging to group AB. *Nature (Lond.)* **183**, 1733 (1959).
11. MOURANT, A. E.: The distribution of human blood groups p. 219—222. Oxford: Blackwell Scientific Publ. 1954.
12. RACE, R. R., and R. SANGER: Blood groups in man, 3rd ed p. 88. Oxford: Blackwell Scientific Publ. 1962.
13. SANGER, R., and R. R. RACE: The MNSs blood group system *Amer. J. hum. Genet.* **3**, 332—343 (1951).
14. SCHOLZ, W., u. J. D. MURKEN: Faktorenaustausch zwischen den Blutgruppen-Genorten MN und Ss. *Z. Humangenetik* **4**, 268—273 (1967).

15. SEYFRIED, H., T. WALEWSKA, and B. WERBLINSKA: Unusual inheritance of ABO groups in a family with weak B antigens. *Vox Sang. (Basel)* **9**, 268—277 (1964).
16. SPIELMANN, W.: Vortr. Tgg. gerichtl. Blutgruppensachverst., Würzburg 1967.
17. WIENER, A. S., L. J. UNGER, and L. COHEN: Distribution and heredity of blood factor U. *Science* **119**, 734—755 (1954).
18. YAMAGUCHI, H., Y. OKUBO, and F. HAZAMA: An A_2B_3 phenotype blood showing atypical mode of inheritance. *Proc. Jap. Acad* **41**, 316—320 (1965).
19. — — Another Japanese A_2B_3 blood group family with the propositus having O-group father. *Proc. Jap. Acad.* **42**, 512—520 (1966).
20. YASUDA, J., H. AMANO, K. MATSUNAGA, and K. HAYAMA: Paper presented at the 14th Congress of Japan Society of Blood Transfusion 1966. Zit. nach 8.

Prof. Dr. med. W. SPIELMANN
Direktor des Blutspendedienstes Hessen
des Deutschen Roten Kreuzes,
6000 Frankfurt a. M., Ludwig-Rehn-Str.