

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2024

Dorota Hetychová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Nemoci spojené s Rh faktorem
Bakalářská práce

2024

Dorota Hetychová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Dorota Hetychová**
Osobní číslo: **C21168**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Nemoci spojené s Rh faktorem**
Téma práce anglicky: **Diseases Associated with the Rh Factor**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši o Rh faktoru. V úvodní části se zaměřte na jeho popis, zmiňte souvislost s krevními skupinami.
2. V hlavní části bakalářské práce se věnujte důkladnému popisu nemocí spojených s Rh faktorem a uveďte konkrétní příklady infekcí. V závěru popište souvislosti mezi Rh faktorem a onemocněním covid-19.
3. Pro zpracování kompilačního textu bakalářské práce čerpejte z odborných článků publikovaných v recenzovaných zahraničních časopisech. Jejich vyhledávání provádějte prostřednictvím elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *NCBI Pubmed*, *ScienceDirect*, *Web of Science*, *Scopus*, apod.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucí bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Pavlína Nývltová, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant bakalářské práce: **RNDr. Jiří Handl, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání bakalářské práce: **22. prosince 2023**
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2024**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem Nemoci spojené s Rh faktorem jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 1. 7. 2024

Dorota Hetychová v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Velice ráda bych poděkovala vedoucí své bakalářské práce Mgr. Pavlíně Nývltové, Ph.D. za přijetí a specifikaci tématu, řadu inspirativních připomínek a zejména velmi vstřícný přístup a ochotu při zpracování jednotlivých kapitol. Dále bych ráda poděkovala své rodině a přátelům, kteří mě v průběhu studia podporovali.

ANOTACE

Bakalářská práce je zaměřena na některé nemoci spojenými s nedostatky a poruchami Rh faktoru. Zabývá se obecným popisem krevního skupinového systému a největší pozornost věnuje funkci Rh faktoru. Dále je věnována popisu různých onemocnění spojenými s Rh faktorem, včetně bakteriálních a virových. Zvláštní pozornost je věnována onemocnění COVID-19 a jeho souvislostí s Rh faktorem.

KLÍČOVÁ SLOVA

Rh faktor, krevní skupiny, erythrocyty, hemolytická nemoc novorozenců, toxoplazmóza, COVID-19

TITLE

Diseases associated with the Rh factor

ANNOTATION

The bachelor's thesis is devoted on some diseases associated with deficiencies and disorders of the Rh factor. It deals with a general description of the blood group system and pays most attention to the function of the Rh factor. It is also devoted a description of various diseases associated with the Rh factor, including bacterial and viral diseases. Particular attention is given to the disease COVID-19 and its associatin with Rh factor.

KEYWORDS

Rh factor, blood groups, erythrocytes, hemolytic disease of newborn, toxoplasmosis, COVID-19

OBSAH

ÚVOD	11
1 Rh faktor a krevní skupiny	12
1.1 Historie Rh systému	12
1.2 Rh faktor	12
1.2.1 Rh geny	13
1.2.2 Rh antigeny	15
1.2.3 Anti-Rh protilátky	16
1.2.4 Rh fenotypy	17
1.3 Testovací metody	20
1.3.1 Testování na podložním sklíčku	20
1.3.2 Zkumavková metoda	21
1.3.3 Mikrotitrační destičky	21
1.3.4 Gelová testovací metoda	21
1.4 ABO systém	22
2 Nemoci spojené s Rh faktorem	23
2.1 Hemolytická nemoc novorozenců	23
2.1.1 Diagnostika a laboratorní nález	24
2.2 Autoimunitní hemolytická anémie	25
2.2.1 AIHA s tepelnými protilátkami	25
2.2.2 AIHA s chladovými protilátkami	25
2.2.3 Paroxysmální chladová hemoglobinurie	26
2.2.4 Léčba	26
2.3 Hemolytická transfuzní reakce	27
2.3.1 Léčba	28
2.4 Syndrom Rh deficiencie	28
2.4.1 Léčba	29
2.5 Toxoplazmóza	29

2.5.1 Diagnostika a léčba	31
2.5.2 Souvislost toxoplazmózy s Rh faktorem.....	32
2.6 Helicobacter pylori.....	33
2.6.1 Léčba.....	35
2.6.2 Souvislost s Rh faktorem a krevními skupinami	35
2.7 Horší zdravotní stav a vyšší výskyt poruch u Rh negativních jedinců	36
3 Rh faktor a onemocnění COVID-19	38
3.1 COVID-19.....	38
3.2 Metody a techniky diagnostiky COVID-19	39
3.4 Souvislost krevních skupin s onemocněním COVID-19	40
3.3 Souvislost Rh faktoru s onemocněním COVID-19	41
ZÁVĚR	43
POUŽITÁ LITERATURA	44

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AHG	anti-humánní globulin
AIHA	autoimunitní hemolytická anémie
AMK	aminokyselina
BaBA	adhezin vázající antigen krevní skupiny
bp	komplementární pár bází
cagA	gen A asociovaný s cytotoxinem
CD8+	cytotoxické T lymfocyty hrající klíčovou roli v imunitním systému
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CFT	komplement fixační test
CNS	centrální nervová soustava
COVID-19	koronavirové onemocnění 2019
CT	výpočetní tomografie, zobrazovací metoda
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EIA	enzymová imunoanalýza
ELISA	enzymatický imunosorbentový test
GTA	glykosyltransferáza A
GTB	glykosyltransferáza B
<i>H.pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HB	hemoglobin
HTR	hemolytická transfuzní reakce
IFA	nepřímá imunofluorescenční analýza
IgA	imunoglobulin A
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
LAT	latexový aglutinační test
MRI	magnetická rezonance
OipA	vnější zánětlivý protein
PCR	polymerázová řetězová reakce
PPI	inhibitory protonové pumpy
Rh	Rhesus faktor
RHAG	gen kódující Rh asociovaný glykoprotein
RhAG	Rh asociovaný glykoprotein

RHCE	gen kódující antigeny C/c a E/e
RhCE	Rh protein zabudovaný do fosfolipidové dvojvrstvy erytrocytu
RHD	gen kódující antigen D
RhD	Rh antigen D krevních skupin
RHD ψ	pseudogen RHD
RNA	ribonukleová kyselina
RT-PCR	polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
vacA	vakuolizující gen cytotoxinu
WHO	Světová zdravotnická organizace

ÚVOD

Objev Rh faktoru a krevních skupinových systémů u lidí K. Landsteinerem a A. Wienerem představuje revoluční změnu v oblasti medicíny. Zejména v oblasti hematologie, perinatální péče a krevních transfuzí.

Lidská populace se rozděluje na jedince Rh pozitivní a Rh negativní, a to podle přítomnosti nebo absence antigenu D na povrchu červených krvinek. Jeho přítomnost nebo absence může vést k vážným komplikacím v případě nesouladu krví dárce a příjemce, nebo mezi matkou a plodem. Nejznámější a nejzávažnější komplikací spojenou s Rh faktorem je hemolytická nemoc novorozenců, jež může mít závažné následky včetně žloutenky, anémie a dokonce i smrti plodu. V této práci byl rovněž kladen důraz na další komplikace, které mohou nastat v důsledku Rh inkompatibility, jako například autoimunitní hemolytické anémie nebo reakce při krevní transfuzi.

Mimo jiné se také ukazuje, že Rh faktor je rizikovým faktorem i u některých bakteriálních a virových infekcí, jako je například infekce způsobená bakterií *Helicobacter pylori* nebo parazitem *Toxoplasma gondii*. Závěrečná část práce se věnuje aktuálním výzkumům spojených s nedávnou pandemií COVID-19 a spojitostí s Rh faktorem.

Cílem této bakalářské práce bylo nejenom podrobně zkoumat nemoci spojené s Rh faktorem, ale do jisté míry reflektovat také prevenci, diagnostiku a léčbu.

1 Rh faktor a krevní skupiny

1.1 Historie Rh systému

V roce 1939 Rufus Stetson a Philip Levine popsali situaci jedné ženy, která porodila mrtvý plod, a protože při porodu ztratila velké množství krve, byla jí podána transfuze krve jejího manžela, který měl stejnou krevní skupinu. Její sérum aglutinovalo erythrocyty jejího manžela a žena prodělala těžkou hemolytickou reakci. Následně po sérii provedených testů došli k závěru, že matka byla imunizována plodem, který nesl Rh antigen zděděný po otci a že její sérum obsahuje zvláštní látku způsobující aglutinaci krvinek jejího manžela (Hillyer Ch et al., 2006).

Mezitím Karl Landsteiner a Alexander Wiener ve snaze objevit další krevní skupiny aplikovali králíkům a morčatům erythrocyty opice makak rhesus. Výsledné antisérum aglutinovalo nejen buňky opic makak rhesus, ale také 85 % buněk skupiny bělochů z New Yorku. Kvůli aglutinaci ve svých pokusech s krví opice vědci Landsteiner a Wiener pojmenovali jistý antigen jako *Rhesus* (Rh) faktor. Aglutinující antisérum následně vědci pojmenovali jako Rh pozitivní. Později bylo zjištěno, že lidé a opice makak rhesus nemají stejné antigeny na erythrocytech, i když název dále přetrvává. Protilátka proti Rh faktoru byla následně přejmenována a původní lidská specifita se stala známou jako anti-D (Rosenkrans D et al., 2023).

Již v roce 1941 bylo zřejmé, že Rh není jednoduchý systém s jedním antigenem. Na základě reaktivity dvou protilátek, jež rozpoznávaly antigeny, pojmenoval Fisher antigeny C a c. Další písmena abecedy, D a E, použil k definici antigenů rozpoznávaných dalšíma dvěma protilátkami. Antigen E byl rozpoznán až v roce 1945 (Payne-James J et al., 2015).

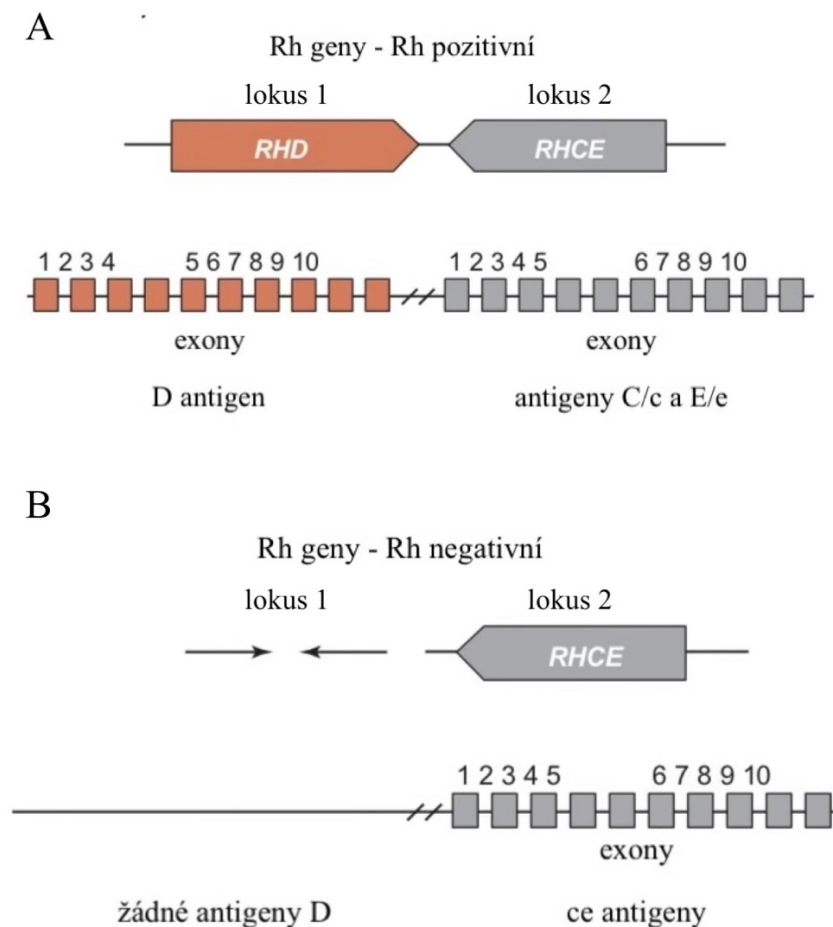
1.2 Rh faktor

Rh faktor je jedním z klíčových faktorů, který hraje důležitou roli v hematologii. Po AB0 krevním systému je druhým nejdůležitějším odvětvím transfuzního lékařství. Na rozdíl od protilátek krevního AB0 systému vyskytujících se u jedinců, kteří nemají příslušný antigen, se anti-Rh protilátky vytváří až po kontaktu s cizími červenými krvinkami. Jakmile jsou přítomny, mohou vyvolat závažné hemolytické onemocnění plodu a novorozence nebo hemolytické transfuzní reakce. Tento systém má více než 50 antigenů. Lze rozlišit pět hlavních a nejdůležitějších antigenů – D, C, c, E, e. Rh antigeny jsou umístěny ve dvou proteinech exprimovaných v membráně erythrocytů a jejich bezprostředních prekurzorech RHD

a RHCE (Rosenkrans D et al., 2023). Nejdůležitější je antigen D, podle jehož přítomnosti na membráně eryocytů je rozlišována populace na Rh pozitivní a Rh negativní.

1.2.1 Rh geny

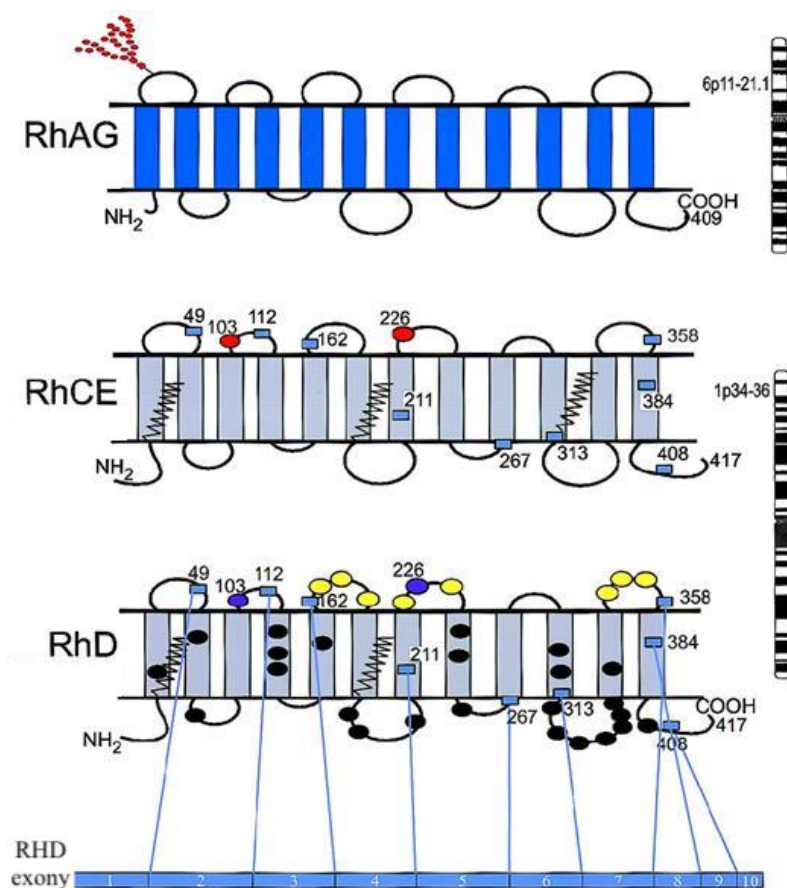
V současné době je známo, že expresi Rh proteinů řídí pouze dva úzce spojené geny umístěné na chromozomu 1p34-36, RHD a RHCE. Gen RHD kóduje přítomnost nebo nepřítomnost antigenu D. Druhý gen RHCE kóduje antigeny C, c, E a e. Gen RHD má dvě alely D/d, přičemž alela D je dominantní k alele d, která je klinicky němou alelou, neboť její produkt nebyl nikdy nalezen. Gen RHCE má čtyři alely CE, Ce, cE a ce, které jsou vůči sobě kodominantní a uvedené kombinace alel se dělí neoddělitelně od sebe a nazývají se genový komplex. Může tak vzniknout až osm genových komplexů – Cde, cde, cDE, cDe, Cde, cdE, CDE a CdE. Na obrázku 1 můžeme vidět strukturní podobu Rh genů. Přítomnost RHD v lokusu 1 znamená přítomnost či nepřítomnost antigenu D. Lokus 2 poté kóduje Ce, CE, cE či ce. Každý gen se skládá z deseti kódujících exonů, jsou z 97 % identické a dědí se jako kodominantní alely (Harmening D et al., 2012).



Obr. 1 - Rh geny s přítomností nebo nepřítomností antigenu D. A) RhD pozitivní, B) RhD negativní. Převzato z (Harmening D et al., 2012).

Rh proteiny jsou hydrofobní a neglykolizované transmembránové proteiny zabudované do fosfolipidové dvojvrstvy erytrocytu s extracelulární expresí antigenů, jejichž model je zobrazen na obrázku 2. Proteiny RhD a RhCE jsou si velmi podobné a liší se pouze o 34 až 37 z 417 aminokyselin (AMK) v závislosti na tom, která alela RHCE je uvažována. Příslušné AMK jsou distribuovány v šesti extracelulárních segmentech zodpovědných za imunitní odpověď, dvanácti transmembránových a sedmi intracelulárních segmentech (Flegel WA, 2007).

Dalším důležitým genem pro expresi antigenu je RHAG, který se nachází na chromozomu 6p12-21. Produktem tohoto genu je Rh asociovaný glykoprotein (RhAG). Glykoprotein RhAG má velmi podobnou strukturu jako Rh proteiny s tím rozdílem, že jsou na něm navázány sacharidy. V membráně erytrocytů tvoří komplexy s Rh proteiny. RhAG se označuje jako koexpresor a musí být přítomen pro úspěšnou expresi Rh antigenů. Sám o sobě však tento glykoprotein neexprimuje žádné Rh antigeny. Pokud dojde k mutacím v RHAG, může to mít za následek absenci nebo výraznou změnu proteinů RhD a RhCE, což následně ovlivňuje expresi antigenů. Ve vzácných případech jedinci neexprimují ve svých erytrocytech žádné Rh antigeny. U těchto jedinců se hovoří o fenotypu RHnull (Harmening D et al., 2012).



Obr. 2 – Model topologie RhAG, RhCE, RhD. Žluté ovály – specifické AMK na exofaciálním povrchu; černé ovály – AMK v transmembránové a cytoplazmatické membráně; červené ovály – AMK kritické pro antigeny C/c a E/e; fialové ovály – Ser103 a Ala226 na RhD; klikaté čáry – motivy pro Cys-Leu-Pro podílející se na palmitoylačních místech; rozvětvená struktura červených kroužků – N glykan na první smyčce RhAG. Převzato z (Neil D et al., 2000).

1.2.2 Rh antigeny

System krevních skupin Rh obsahuje přes 50 antigenů. Mezi pět klinicky nejvýznamnějších antigenů patří D, C, c, E a e. Jejich přehled a antigenní frekvenci můžeme vidět v tabulce 1.

Tab. 1 - Přehled antigenů a jejich procentuální četnost u bílé populace.
Převzato z (Ranjan S et al., 2023).

Antigen	Frekvence (%)
D	85
C	68
c	80
E	29
e	98

Antigen D, objevený v roce 1939, je prvním popsáným antigenem Rh faktoru. Jedná se o soubor konformačně závislých epitopů podél celého RhD proteinu. Antigen D je nejsilnější v antigennosti ze všech antigenů Rh systému. Dle přítomnosti D antigenu je populace rozdělena na Rh pozitivní a Rh negativní jedince. Rh negativní fenotyp je u většiny populace spojen s delecí antigenu D. V jiných populacích, zejména Japonců nebo afrických černochů, je Rh negativní fenotyp spojen s nedostatečnou expresí D antigenu (Flegel WA, 2007).

V roce 1946 byla objevena kvantitativní varianta se slabě exprimovaným D antigenem, nazývaná jako varianta Du. Nyní je tato varianta nazývána slabé D a má klinický a diagnostický význam, jelikož červené krvinky pacientů exprimují tento typ slabého antigenu D a nevytvářejí protilátky anti-Rh. Jedinci, jejichž červené krvinky mají pozměněnou formu RhD proteinu, mohou vytvářet aloanti-Rh protilátky. Tato varianta je nazývána částečné D. Tyto červené krvinky v závislosti na tom, které D epitopy jsou změněny, jsou aglutinovány částí anti-Rh činidel (Neil D et al., 2000).

Mezi další klinicky důležité Rh antigeny patří také antigeny C/c nebo E/e. Jsou výsledkem změn RhCE proteinu pouze v pěti AMK a oproti antigenu D jsou slabší ve své antigennosti. Nejsou tak významné, přesto mohou v případě inkompatibility vyvolat tvorbu protilátek. Často existují dvě varianty, jež se liší v jednom umístění AMK a to Rh antigeny E a e. Páry antigenů C/c a E/e nejsou protikladné, protože jsou výsledkem substitucí na různých místech. Existují čtyři možné kombinace ($Ce > ce > cE > CE$) a vyskytují se v různých frekvencích a dědí se jako haplotypy. Antigen C se nejčastěji vyskytuje v kombinaci s antigenem D, oproti tomu gen c je nejčastěji v kombinaci s genem d a e. Antigen E bývá nejčastější příčinou aloimunizace u těhotných žen a vyskytuje se nejčastěji v kombinaci s antigenem D (Flegel WA, 2007).

1.2.3 Anti-Rh protilátky

I přesto, že Rh systém byl dříve detekován pomocí testů s fyziologickým roztokem, který se používá k detekci protilátek IgM, většina anti-Rh protilátek je typu IgG. Anti-Rh protilátky se obvykle vytvářejí po vystavení imunitního systému jedince cizím erytrocytům, a to buď během transfuze nebo během těhotenství. Stejně jako u většiny protilátek proti krevním skupinám se zpočátku tvoří IgM anti-Rh protilátky, po nichž následuje přechod na IgG. Anti-Rh protilátky často přetrvávají v oběhu po několik let (Dean L, 2005). U jedinců s nízkým titrem protilátek může dojít k anamnestické sekundární protilátkové odpovědi, zejména pokud

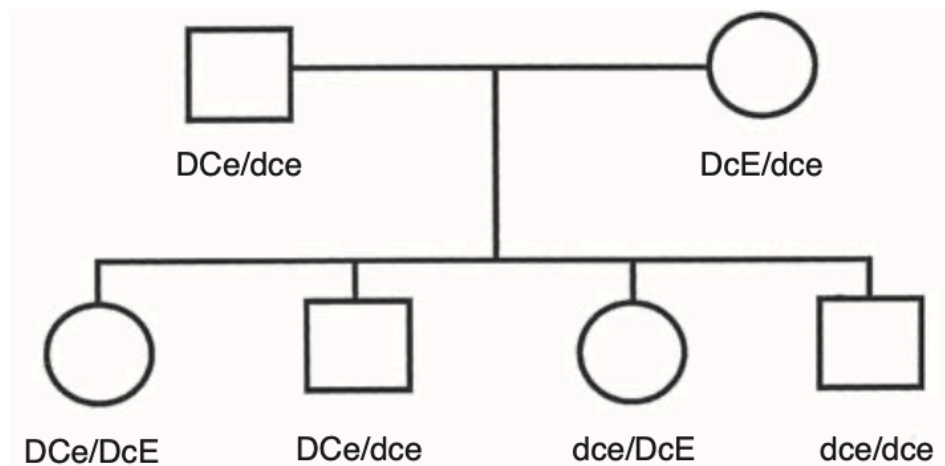
jsou vystaveni stejnému senzitivnímu antigenu. Proto je přesnost typizace D zásadní, stejně tak jako pečlivá kontrola pacienta, aby se zjistilo, zda již dříve nebyla anti-Rh protilátka identifikována. Většina běžně nalezených anti-Rh protilátek je považována za klinicky významné. Byly také zaznamenány podtřídy anti-Rh protilátek IgG1, IgG2, IgG3 a IgG4. Největší klinický význam mají IgG1 a IgG3, jelikož erythrocyty s těmito podtřídami protilátek jsou retikuloendoteliálním systémem rychle odstraňovány z oběhu. Byly také zaznamenány anti-Rh protilátky typu IgA, ty se ovšem v krevní bance rutinně nevyšetřují (Harmening D et al., 2012).

Anti-Rh protilátky neváží komplement. Aby došlo k fixaci komplementu nebo k aktivaci komplementové kaskády, musí se dva imunoglobuliny IgG navázat na antigen erythrocytu v těsné blízkosti. Rh antigeny s již navázanou protilátkou se na povrchu erythrocytu takto blízko nenacházejí. Proto když anti-Rh protilátka pokryje erythrocyt, nedojde k intravaskulární komplement zprostředkované hemolýze. Destrukce erythrocytu v důsledku anti-Rh protilátek je primárně extravaskulární. Bylo však také zaznamenáno několik vzácných příkladů vazby anti-Rh protilátek na komplement (Harmening D et al., 2012).

1.2.4 Rh fenotypy

Genotyp je skutečná genetická výbava pacienta a vliv genů lze klinicky vidět podle vnímaného důsledku, který je charakterizován jako fenotyp. Rozlišujeme fenotypy Rh pozitivní, Rh negativní, slabé D, parciální D, Rh null fenotyp a RhCE varianty.

Prvním z fenotypů je Rh pozitivní. Rh pozitivní jedinci mají v membráně svých erythrocytů přítomen antigen D. Tito jedinci dědí jeden nebo dva RHD geny, které následně vedou k expresi RhD antigenu a jsou typizováni jako Rh pozitivní. Kromě genů RHD se dědí také dva geny RHCE, jeden od každého rodiče. Na obrázku 3 je znázorněn příklad normálního vzorce dědičnosti Rh, kdy každý jedinec zdědil jeden RHD gen (D nebo d) a dva geny RHCE (C/c, E/e) (Harmening D et al., 2012).



Obr. 3 – Příklad normálního vzorce dědičnosti Rh. Převzato z (Harmening D et al., 2012).

U Rh negativních jedinců v zásadě existují tři molekulární mechanismy negativity RHD. První je totální delece genu RHD, druhým pseudogen RHD a třetím typem je hybridní gen. Frekvence těchto mechanismů se vyskytuje u tří různých etnických skupin: Evropanů, Afričanů a Asiatů (Rosenkrans D et al., 2023).

U Evropské populace je nejčastějším mechanismem úplná delece genu RHD. Rh negativní fenotyp je nejčastěji způsoben homozygotním haplotypem, ve kterém byl odstraněn RHD gen. K této deleci dochází v takzvaných *Rhesus* boxech v oblasti, která byla pravděpodobně způsobená vadným zarovnáním chromozomů během meiózy. To má za následek nestejný přechod mezi *Rhesus* boxy. Výsledkem této mutace je absence RHD genu a zdědění dvou genů RHCE (Nardozza LM et al., 2010).

U Afrického etnika s Rh negativním fenotypem je nejčastějším mechanismem přítomnost pseudogenu RHD, RHD ψ . RHD pseudogen je asociovaný RHD negativní alelou, jejíž sekvence je identická s genem RHD. S výjimkou přítomnosti duplicitní sekvence 37 bp a missense mutace v exonu 5 a 6, což způsobí vytvoření stop kodonového signálu. Tímto způsoben je produkován nefunkční protein a polypeptid D se nedostane na povrch erytrocytů. Druhým nejčastějším Rh negativním fenotypem u afrického etnika je hybridní gen. Genovou konverzí jsou často tvořeny hybridní alely RHD-CE-D a RHCE-D-CE. (Harmening D et al., 2012).

U větší části asijské populace je pozorována již popsaná delece genu RHD. Objevuje se také další mutace, jež mění gen RHD a způsobuje, že jedinec je typicky Rh negativní. Tato mutace se označuje jako Del a patří mezi slabý D (Nardozza LM et al., 2010).

Přibližně 1 % Rh pozitivních jedinců je označováno jako slabé D. Obecně mají červené krvinky u Rh pozitivních jedinců antigenní počet v rozmezí 15 000 až 33 000 antigenů na buňku, a to v závislosti na haplotypu. Byl ovšem identifikován fenotyp slabé D s počtem antigenů v rozmezí 70 až 5200 na buňku. Tyto fenotypy jsou způsobeny substitucí AMK v transmembránové a intracelulární části proteinu RhD v důsledku jediné missense mutace genu v RHD. To zapříčiní slabou nebo chybějící aglutinaci erytrocytů anti-Rh protilátkami během rutinního sérologického testování. U jedinců se slabým D fenotypem vyžaduje D antigen obvykle zesílení anti-humánním globulinem AHG kvůli kvantitativnímu poklesu RhD proteinu. V současné době bylo identifikováno přes 40 typů slabého D. Typy 1, 2 a 3 jsou nejběžnější a produkují dostatek epitopů D antigenu, aby byly řízeny jako Rh pozitivní. Pacientky ve fertilním věku, které jsou pozitivní na slabý fenotyp D, by měly podstoupit další genotypizaci, aby se zjistilo, zda je nutná imunoprolaxe během těhotenství (Rosenkrans D et al., 2023).

Mezi další z fenotypů patří i takzvaný parciální D fenotyp. Červené krvinky u tohoto fenotypu jsou definovány absencí jednoho nebo více epitopů u antigenu D, způsobenou přeskupením genů RHD a RHCE. Tato genetická konfigurace umožňuje mikrokonverzi a jednosměrné výměny fragmentů nebo částí genů RHD a RHCE, což vede k tvorbě alel RHD-CE-D, respektive RHCE-D. Tyto nové Rh alely nejen produkují hybridní proteiny vedoucí ke ztrátě D epitopů, ale také generují nové antigeny. Některé parciální D fenotypy jsou výsledkem výměn pouze jedné AMK. Na rozdíl od slabého D fenotypu se však polymorfismus vyskytuje v extracelulárních segmentech proteinu RhD. Většina pacientů s parciálním D fenotypem bude Rh pozitivní. Jedinci s částečným D mohou často produkovat anti-Rh protilátky, pokud jsou vystaveni D-pozitivním erytrocytům, a vyžadují tak zvláštní pozornost při transfuzi a během těhotenství (Nardoza LM et al., 2010).

Vzácným fenotypem charakterizovaným nedostatkem exprese všech Rh antigenů na erytrocytech je Rh null fenotyp. Fenotyp je dále klasifikován na regulátorový a amorfní typ na základě genetického defektu. Amorfní typ nastává z mutace RHCE, což vede k nefunkčním proteinům. Regulátorový typ nejběžněji nastává v důsledku mutace RHAG, jež produkuje dysfunkční RhAG. U některých aloimunizovaných pacientů s Rh null fenotypem se mohou vyvinout protilátky anti-RH29, tato protilátka však nereaguje s Rh null erytrocyty. Klinicky mají pacienti zkrácenou životnost erytrocytů a trpí syndromem Rh deficiencie (Qureshi A et al., 2010).

Posledním zmíněným fenotypem jsou RhCE varianty. Polymorfismy RhCE se vyskytují v důsledku jedné nebo více nukleotidových substitucí v RHCE. Alely E a e se liší pouze

substitucí AMK, a to prolinu za alanin. Avšak polymorfní alely C a c mají čtyři různé substituce AMK. Expres těchto různých alel významně ovlivňuje pacienty, kteří dostávají chronické transfuze, protože se u nich mohou častěji vyvinout aloprotilátky. Aloimunizací jsou ohroženi zejména pacienti se srpkovitou anémií (Rosenkrans D et al., 2023).

1.3 Testovací metody

Rh typizace detekuje přítomnost nebo nepřítomnost antigenu D na povrchu erytrocytů a provádí se analogicky jako AB0 typizace. Během Rh typizace jsou červené krvinky pacienta kombinovány s reagenčními anti-Rh protilátkami. Výsledná přítomnost či nepřítomnost aglutinace rozděluje Rh pozitivní a negativní stav. Detekce slabého D nebo parciálního D fenotypu není rutinně vyžadována pro předtransfúzní testování, probíhá ovšem v případech nejednoznačné Rh typizace (Mitra R et al., 2014).

Pro testování Rh krevní skupiny mohou být použity různé metody, mezi které patří například testování na podložním sklíčku, zkumavková metoda, využití mikrotitračních destiček či gelová testovací metoda. Sérologické vyšetření je nejčastěji založeno na hemaglutinačních reakcích s antigeny erytrocytů proti specifickým protilátkám. Proces hemaglutinace probíhá ve dvou fázích. V prvním kroku, nazývaném také senzibilizace erytrocytů, dochází ke spojení paratopu a epitopu v reverzibilní reakci. Antigen a protilátka jsou spojeny pomocí nekovalentní vazby. Během druhé fáze tvoří více červených krvinek s navázanými protilátkami stabilní mřížku pomocí můstků antigen-protilátka. Tato mřížka je základem všech viditelných aglutinačních reakcí. Reagencie detekující antigen D v testech na sklíčku, ve zkumavce, mikrotitrační destičce či automatických a gelových testech, mají často různé složení nebo provedení (Rosenkrans D et al., 2023).

1.3.1 Testování na podložním sklíčku

Sklíčkový test je nejméně citlivou metodou pro stanovení krevních skupin a Rh faktoru. Ovšem díky rychlým výsledkům je velmi cenný v naléhavých případech. Při této metodě se na čisté podložní sklíčko či porcelánovou podložku kápne 40% až 50% suspenze červených krvinek a vedle ní kapka anti-Rh séra. Pomocí krouživých pohybů jsou tyto dvě kapky smíchány. Vizually lze pozorovat aglutinaci pouhým okem. Výsledek je považován za pozitivní, pokud vzorek pacienta vykazuje aglutinaci. Test je hotový za 5 až 10 minut a je levný, jelikož vyžaduje malý objem činidel. Citlivost této metody je nízká a může být snadno ovlivněna více faktory, což stěžuje standardizaci (Mujahid A et al., 2015).

1.3.2 Zkumavková metoda

Zkumavkovou metodu lze použít pro nouzové a první typizace krevních skupin. Tato metoda je citlivější oproti metodě sklíčkové. Při této analýze se ve zkumavce kombinuje pacientova plazma obsahující protilátky a typové erythrocyty. Alternativní metodou může být smíchání diagnostických monoklonálních sér se suspenzí pacientových erythrocytů. Směsi procházejí řadou kroků centrifugace a inkubace s následnou kvantifikací aglutinace. Nejsilnější aglutinace, tedy pozitivní reakce, může být pozorována vznikem shluku erythrocytů po jemném poklepání na zkumavku. Zatímco negativní reakce vede při stejném poklepu na zkumavku k úplné disociaci na jednotlivé erythrocyty, čili erythrocyty se neshlukují (Rosenkrans D et al., 2023).

1.3.3 Mikrotitrační destičky

Mezi další testovací metody patří mikrotitrační technologie. Jedná se o citlivější a rychlejší stanovení krevních skupin s možností automatizace. Při této technice lze stanovit jak protilátky v krevní plazmě, tak i antigeny přítomné na erythrocytech. Typické mikrotitrační destičky se skládají z velkého počtu malých jamek, které obsahují činidla, jež jsou zpracována proti krevním vzorkům. Po odstředění a inkubaci lze následnou aglutinaci detekovat pomocí automatického odečítacího zařízení. Hlavní výhodou technologie mikrotitračních destiček je rychlá odezva, nízké objemy činidel a vysoká výkonnost analýzy (Mujahid A et al., 2015).

1.3.4 Gelová testovací metoda

Technologie sloupcové gelové aglutinace byla zavedena v 90. letech 20.století. Je to široce dostupná alternativní sérologická testovací metoda, která využívá mikrozukumavky obsahující dextran akrylamidový gel zabudovaný do malých plastových karet. Krevní sérum nebo buňky se smíchají s anti-Rh činidly v mikrozukumavkách za kontrolované inkubace a centrifugace. Gelové částice zachytí aglutináty, zatímco neaglutinované krevní buňky mohou kolonou projít. Dobu analýzy lze zkrátit použitím skleněných kuliček místo gelového materiálu. Díky skleněným kuličkám lze dosáhnout vyšší rychlosti centrifugace, což vede k rychlým výsledkům. Tato technologie je citlivá, přesná, jednoduchá a poměrně snadno ovladatelná (Li HY et al., 2022).

1.4 AB0 systém

Oproti Rh systému, kde jsou jedinci rozdělováni pouze na Rh pozitivní a Rh negativní, v AB0 systému lidé mohou být rozděleni do čtyř hlavních skupin A, B, 0 a AB a to na základě vzorců aglutinace jejich červených krvinek. Systém krevních skupin se skládá z antigenů A, B a H na červených krvinkách a jejich odpovídajících protilátek v séru, jejichž přehled můžeme vidět v tabulce 2. Protilátky anti-A a anti-B jsou přirozeně se vyskytující, typu IgM. Jejich produkce je stimulována, pokud imunitní systém narazí na „chybějící“ antigeny krevní skupiny AB0 v potravinách nebo v mikroorganismech. To se děje již v raném věku, jelikož cukry, které jsou totožné nebo velmi podobné antigenům krevní skupiny AB0, se nacházejí v celé přírodě (Dean L, 2005).

Tvorba antigenů A, B a H je výsledkem interakce genů ve třech různých lokusech AB0, Hh a Se. Tyto geny ve skutečnosti nekódují tvorbu antigenů, ale produkují specifické glykosyltransferázy, jež přidávají cukry k základní prekurzorové látce. Jedinci skupiny 0 mají antigen H nacházející se na chromozomu 19, který tvoří H antigen. Tento antigen slouží jako prekurzorový oligosacharid potřebný k vytvoření antigenů A a B. Pokud jsou přítomny oba geny A i B, pak se některé z H stanou A a některé B. Tím se vytvoří skupina AB. Pokud je ovšem H gen defektní nebo není přítomen, pak H antigen nemůže být vytvořen, a tudíž nemůže být vytvořen ani antigen A a B. Důsledkem je vzácný fenotyp známý jako Bombajský fenotyp. Pacienti s tímto fenotypem mají protilátky v plazmě podobné těm, které jsou přítomny v plazmě jedinců typu 0, ale mají také klinicky významné protilátky anti-H. Jedinci skupin A a B mají oligosacharidové antigeny A nebo B vznikající reakcemi katalyzovanými glykosyltransferázami. Lidský gen AB0 se nachází na chromozomu 9 a skládá se ze 7 kódujících exonů. Funkční alely A a B kódují glykosyltransferázy A a B, což vede k syntéze antigenů A a B. V důsledku nukleotidových záměn vedoucích k záměnám AMK kódují geny A a B transferázy s různou cukernou specifitou (Romanos-Sirakis EC et al., 2023).

Antigeny A, B a H se vyvíjejí již na počátku života plodu, ale během gestačního období se jejich síla příliš nezvyšuje. Odhaduje se, že erythrocyty novorozence nesou 25-50 % počtu antigenních míst, jež se nacházejí na erythrocytech dospělého člověka. V důsledku toho jsou reakce červených krvinek novorozence s AB0 reagenčními antiséry často slabší než reakce s buňkami dospělého člověka. Exprese antigenů A a B na erythrocytech je plně vyvinuta do 2 až 4 let věku a zůstává konstantní po celý život. Kromě věku se fenotypová exprese antigenů A, B, H může lišit v závislosti na rase, genetické interakci a chorobných stavech (Harmening D et al., 2012).

Tab. 2 - Přehled antigenů, protilátek a následných genotypů AB0 systému.
Převzato z (Dean L, 2005).

Krevní skupina	Antigeny na erythrocytech	Protilátky v séru	Genotypy
A	A	anti-B	AA nebo A0
B	B	anti-A	BB nebo B0
AB	A a B	žádné	AB
0	žádné (jen H)	anti-A a anti-B	0

2 Nemoci spojené s Rh faktorem

2.1 Hemolytická nemoc novorozenců

Hemolytická nemoc novorozenců neboli *erythroblastosis fetalis* je onemocnění způsobené inkompatibilitou erythrocytů mezi matkou a plodem. Onemocnění vzniká v důsledku produkce specifických mateřských protilátek namířených proti antigenům na fetálních erythrocytech, zejména antigeny RhD. Toto onemocnění může způsobit perinatální mortalitu a nemocnost se značným rizikem dlouhodobých následků. Do krevního oběhu dítěte pronikají přes placentu pouze protilátky IgG. Tyto protilátky zkracují přežívání erythrocytů na padesát až sedmdesát dní (Rosenkrans D et al., 2023).

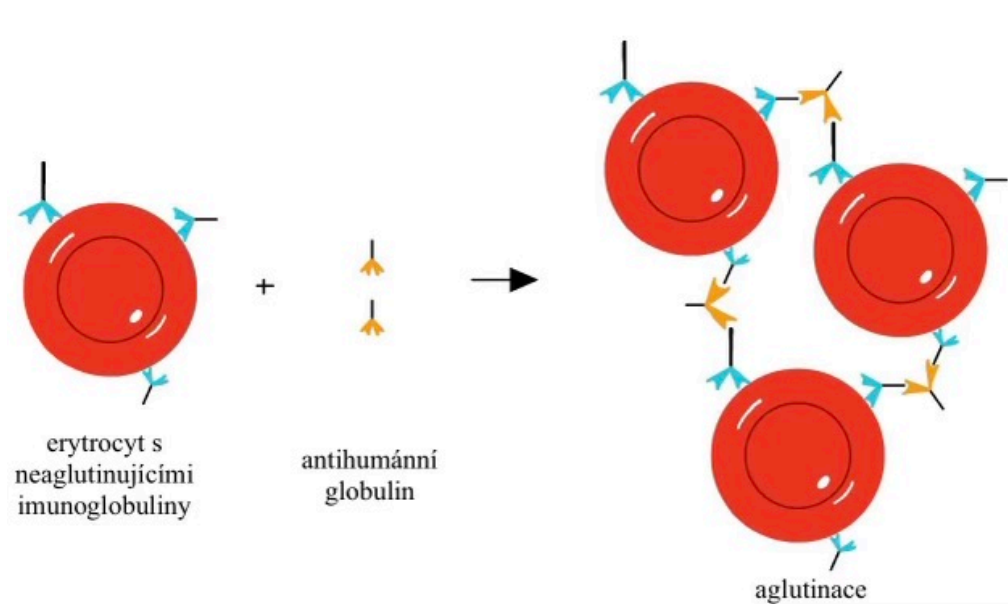
Samotné onemocnění vzniká, pokud je Rh negativní těhotná žena vystavena D antigenu přítomným na červených krvinkách plodu, které zdědilo od otce. Při prvním kontaktu s antigenem vznikají protilátky IgM s vysokou molekulovou hmotností a neprocházejí placentární bariérou, a tudíž neovlivní plod. Při dalším těhotenství mateřské protilátky velmi rychle identifikují antigeny červených krvinek plodu, na které se navážou. Dojde k přepnutí izotopu a produkují se protilátky typu IgG, které již díky své velikosti procházejí přes placentu. Následně dojde k aloimunitní destrukci plodu vedoucí k anémii (Rosenkrans D et al., 2023).

Vzniklou anémii plod kompenzuje vyšší extramedulární erythropoézou vedoucí k hepatosplenomegalii s jaterní dysfunkcí a k vyšší rychlosti průtoku krve organismem, který zajišťuje adekvátní oxygenaci tkání, zejména mozku. Následky rozvíjející se anémie může být například nekonjugovaná hyperbilirubinemie, a to již v prvních 24 hodinách života. Vyznačuje se vysokou hladinou bilirubinu v pupečnickové krvi, který může způsobit žloutenku.

V extrémních případech může bilirubin proniknout do mozku a způsobit poškození nervových buněk vedoucí ke kernikteru. Kernikterus může mít dlouhodobé neurologické následky, včetně mentální retardace, postižení sluchu, popřípadě pohybových problémů (Neamțu SD et al., 2022).

2.1.1 Diagnostika a laboratorní nález

V krevním obrazu pacientů se vyskytuje normocytární anémie, leukocytóza s neutrofilii, trombocytopenie a retikulóza. Po zhotovení krevního nátěru jsou pod mikroskopem často vidět normoblasty, u AB0 inkompatibility sférocyty. V krvi můžeme diagnostikovat zvýšenou hladinu nepřímého bilirubinu. Stanovuje se také přítomnost protilátek proti erytrocytům, a to tzv. Coombsovým testem, který vychází pozitivní (Sarwar A et al., 2023). Antiglobulinový neboli Coombsův test je metoda prokazující přítomnost protilátek nebo komplementu vázaného na membrány červených krvinek pomocí antihumánního globulinu za účelem vytvořit aglutinační reakci. K diagnostice hemolytických anémií způsobených antierytrocytárními protilátkami slouží Coombsův test přímý, jehož princip můžeme vidět na obrázku 4 (Parker V et al., 2017).



Obr. 4 - Princip přímého Coombsova testu. Převzato z (Slováková et al., 2013).

Je důležité, aby ženy během těhotenství měly pravidelnou prenatalní péči a diskutovaly s lékařem o svém zdravotním stavu a možných rizicích minimalizujících nebezpečí vzniku hemolytické novorozenecké anémie. V průběhu každého těhotenství je běžnou praxí určovat krevní skupinu v AB0 a Rh systému. Dalším důležitým nástrojem pro identifikaci

hemolytického onemocnění novorozenců je vyšetření antierytrocytárních protilátek. Léčebným postupem využívaným k prevenci onemocnění je podání anti-D gamaglobulinu. Anti-D gamaglobulin neutralizuje Rh pozitivní erytrocyty plodu, které pronikají do oběhu matky. Podává se matce během prvních 72 hodin porodu. Toto opatření se provádí i po potratu, mimořádném porodu nebo při jakékoli události, při které dochází k mísení krve matky a plodu (de Haas M et al., 2015).

2.2 Autoimunitní hemolytická anémie

Autoimunitní hemolytická anémie (AIHA) je extrakorpuskulární hemolytická anémie, u níž příčinou destrukce krvinek jsou mechanismy vznikající mimo erytrocyt. Jde o hemolytické stavy, které vznikají kvůli tvorbě protilátek typu IgG nebo IgM. Zmíněné protilátky se vážou na povrchové antigeny erytrocytů. Může to vést k destrukci erytrocytů prostřednictvím komplementového systému a retikuloendoteliálního systému. Tímto druhem anémie trpí především dospělí, i když jsou v některých případech postiženy děti, například s autoimunitním lymfoproliferativním syndromem (Bass GF et al., 2014).

Dle základní klasifikace se rozděluje autoimunitní hemolytická anémie na primární, tzv. idiopatickou, a sekundární. Dále podle charakteru protilátek a podle optimální teploty reaktivity erytrocytárních protilátek dělíme onemocnění na AIHA s tepelnými protilátkami, s chladovými protilátkami, se smíšeným typem protilátek a hemolytické anémie vyvolané léky nebo paroxysmální chladovou hemoglobinurii. Přehled typů AIHA je uveden v tabulce 3 (Čermák J, Písačka M., 2018).

2.2.1 AIHA s tepelnými protilátkami

Tepelné protilátky jsou zodpovědné za 48-70% případů AIHA. Jsou převážně typu IgG a k optimální vazbě na erytrocyty dochází při teplotě 37 °C. Tepelné protilátky jsou namířeny proti antigenům Rh systému, vzácněji pak proti ostatním antigenům krevních systémů. Závislost na teplotě této reakce je patrná změnou konformace molekul autoprottilátky, jež je součástí membrány erytrocytu. Při 37 °C je antigen zapuštěn do membrány (Bass GF et al., 2014).

2.2.2 AIHA s chladovými protilátkami

Autoimunitní hemolytická anémie s chladovými protilátkami je způsobena protilátkami typu IgM. Protilátky optimálně reagují při teplotě 4 °C. Teplotní amplituda je široká a tyto

protilátky mohou reagovat až v rozmezí 0-37 °C. Nejčastěji jsou chladové protilátky zjišťovány proti antigenům I/i. Díky své pentametrické struktuře jsou IgM schopny aglutinace a aktivují komplement (Despotovic JM, Kim TO, 2022).

2.2.3 Paroxysmální chladová hemoglobinurie

Toto onemocnění vyvolávají protilátky Donathova-Landsteinerova typu, nazývají se také bifázické chladové hemolyziny typu IgG. Tyto protilátky jsou schopny vázat antigen při nízkých teplotách, ale k hemolýze může dojít za tělesné teploty. Protilátky se tedy v ochlazených částech těla naváží na erythrocyty a při oteplení dochází k hemolýze. Protilátka je silným bazickým hemolyzinem, který se za chladu naváže na erythrocyty a fixuje komplement (Čermák J, Písačka M., 2018).

Tab. 3 - Přehled typů autoimunitních hemolytických anémií. IgG – imunoglobulin G, IgM – imunoglobulin M, I – vazebný antigen erythrocytů I, i – vazebný antigen erythrocytů i, P - vazebný antigen erythrocytů P, C1q - vazba na komplement, Fcγ – vazba na makrofág, C3b – vazba na makrofág. Převzato z (Čermák J, Písačka M., 2018).

Parametr	AIHA s tepelnými protilátkami	AIHA s chladovými protilátkami	paroxysmální chladová hemoglobinurie
Typ protilátky	IgG	IgM	IgG
Vazebný antigen erythrocytů	Rh	I/i	P
Optimum aktivity	37°C	4°C	4°C
Vazba komplementu	C1q (1 vazebné místo)	C1q (2 vazebná místa)	C1q (1 vazebné místo)
Vazba na makrofág	Fcγ, C3b	C3b	Fcγ, C3b

2.2.4 Léčba

Léčba je rozdělena do tří linií. Standardní léčbou první linie je stále podávání glukokortikoidů. Dávka a způsob podávání závisí na iniciální hodnotě hemoglobinu. U nemocných s lehčí formou hemolýzy (Hb > 110 g/l) je podán Prednison po dobu 3 – 4 týdnů. Nemocní s těžkou formou hemolýzy (Hb > 80 g/l) by měli být hospitalizováni na specializovaném hematologickém oddělení, nebo na jednotce intenzivní péče, kde jsou podávány vyšší dávky glukokortikoidů. Jako efektivní léčba se hodnotí dosažení stabilní hodnoty hemoglobinu (Hb > 100 g/l) bez potřeby transfuzí erythrocytů (Jäger, Ulrich, et al., 2020). Léčba druhé linie je indikována u nemocných refrakterních na léčbu první linie, což znamená nedostatečná odpověď do 3 týdnů po zahájení léčby. Dále je také indikována

u nemocných, u nichž je nutno podávat vysokou udržovací dávku glukokortikoidů a také při opakovaných relapsech choroby, zejména v prvním roce léčby. U nemocných mladších 65 let v dobrém klinickém stavu je možno ve 2. linii léčby indikovat splenektomii, chirurgický zákrok, při kterém je odstraněna slezina. Nemocní vyžadující po splenektomii další léčbu mohou odpovědět na nízké dávky kortikosteroidů (Čermák J, Písačka M., 2018). Možnosti třetí linie zahrnují splenektomii nebo alternativní imunosupresi, podání Cyklofosfamidu či Cyklosporinu v dávce 2 – 3 mg/kg/den. Indikace k podání transfuzí erytrocytů závisí na hloubce anémie a rychlosti jejího vzniku, věku a na stavu kardiovaskulárního systému. Vždy je potřeba monitorovat nemocného na lůžku a podávat transfuzi pod clonou glukokortikoidů (Jäger, Ulrich, et al., 2020).

2.3 Hemolytická transfuzní reakce

Jednou z nejvýznamnějších komplikací autologní krevní transfuze jsou hemolytické transfuzní reakce. Tyto reakce jsou důsledkem imunologické neshody nebo inkompatibility mezi erytrocyty od dárce a příjemce transfuze. Nesoulad mezi erytrocyty způsobí hemolýzu, neboli rozpad a únik červených krvinek do intravaskulárních nebo extravaskulárních prostorů. Mohou být také rozděleny na akutní versus opožděné reakce. Akutní hemolytická reakce se objevují do 24 hodin od podání transfuze. Opožděné reakce se objevují po 24 hodinách, obvykle 2 týdny po transfuzi, ale mohou nastat také až 30 dní po transfuzi. Závažnosti hemolytických reakcí závisí na typu a množství antigenu, aloprotilátek a na přítomnosti či absenci aktivace komplementárního systému. Různé typy hemolytických reakcí závisí také na etiologii (Rout P et al., 2023).

Dle místa rozpadu erytrocytů rozlišujeme dva typy hemolytických reakcí – intravaskulární a extravaskulární. Intravaskulární hemolýza nastává, když protilátka způsobující aktivaci komplementu váže erytrocytární antigen. Extravaskulární hemolýza nastává, pokud protilátka cílená na erytrocytární antigen opsonizuje erytrocyt. Opsonizované buňky jsou izolovány makrofágy retikuloendoteliálního systému, především v játrech a slezině. Extravaskulární hemolýza je pomalejší a progresivnější proces, protože každý erytrocyt může provést před fagocytózou několik průchodů retikuloendoteliálním systémem (Merle NS et al., 2019).

Na rozdíl od intravaskulární hemolýzy se hemoglobin uvolňuje uvnitř makrofágu, kde se také zpracovává fyziologicky. Klinické projevy extravaskulární hemolýzy jsou typicky mírnější, vedou k hyperbilirubinemii a horečce způsobené aktivací makrofágů a zvýšenou

tvorbou protizánětlivých cytokinů. Mohou se ale ovšem objevit i závažnější komplikace, jako je selhání ledvin (Rout P et al., 2023).

Hemolytické transfuzní reakce se také klasifikují podle závažnosti a doby nástupu. Hlavním určujícím faktorem nástupu a závažnosti reakce je třída protilátek IgG nebo IgM. K nejzávažnějšímu typu HTR dochází během nesouladu AB0, typicky v důsledku chyby. Pacienti vytvářející AB antigeny tak činí díky molekulárním mimikrám a antigenové prezentaci gastrointestinálních bakterií. Tyto protilátky jsou příznačně typu IgM, ale mohou být také typu IgG. K závažným reakcím dochází, pokud se IgM váže na antigeny typu AB0 na červených krvinkách, a následně fixuje komplement, čímž vzniká náhlá a masivní intravaskulární ruptura červených krvinek. Hemolýza uvolní velké množství hemoglobinu, což má za následek šok, selhání ledvin nebo diseminovanou intravaskulární koagulaci vedoucí ke krvácení (Rosenkrans et al., 2023).

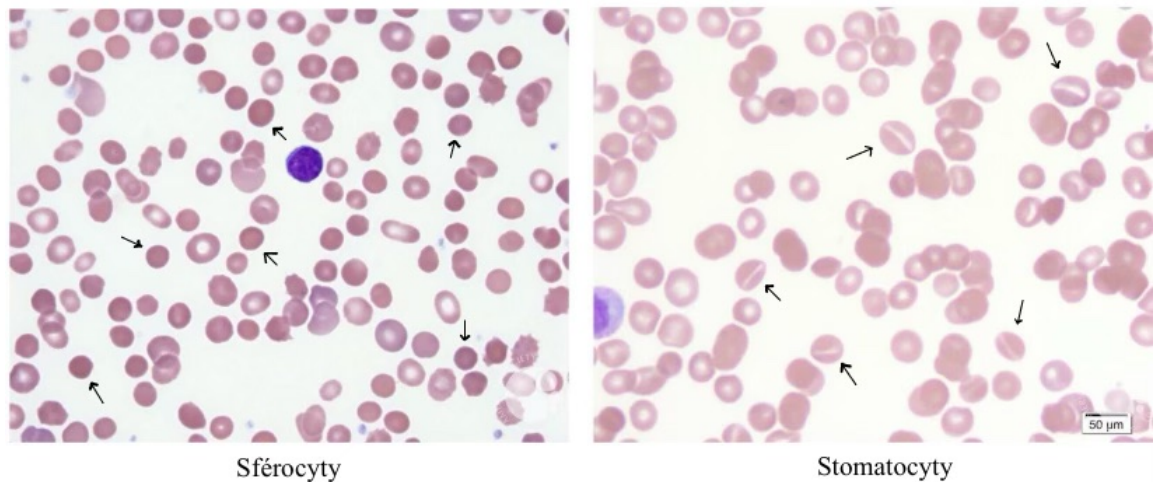
2.3.1 Léčba

Hemolytické transfuzní reakce se mohou lišit závažností a je nezbytné je rychle identifikovat a léčit, jelikož mohou být životu ohrožující. Prvním krokem je vždy zastavit transfuzi. Při vysokém klinickém podezření na vyvolání reakce nebo při závažných příznacích je nutná okamžitá resuscitace a neodkladná léčba. Mezi závažné příznaky patří dýchací potíže, uzavírání dýchacích cest nebo hypotenze. Obvykle se podávají kortikoidy, antihistaminika a adrenalin, a to v případě ohrožení dýchacích cest. Pacient by měl být silně hydratován, aby se snížily komplikace, jako je akutní poškození ledvin, nebo diseminovaná intravaskulární koagulace. Výměnná transfuze se používá jako léčba poslední záchrany (Rout P et al., 2023).

2.4 Syndrom Rh deficiencie

V erythrocytech jedinců, kteří mají fenotyp Rh null chybí Rh proteiny a tudíž i Rh antigeny. Tento fenotyp je velmi vzácný a nejčastěji je výsledkem příbuzenského koitu. Syndrom Rh deficiencie je spojen s větším výskytem stomatocytů, které mají tvar pootevřených úst a bochníkových sférocytů v krvi. Krevní nátěr s výskytem obou erythrocytů s tvarovou odchylkou můžeme vidět na obrázku 5. S větším výskytem sférocytů je spojena zvýšená osmotická fragilita a změněný objem buněk. S tímto onemocněním se také pojí defektní toky kationtů a zvýšená aktivita Na⁺/K⁺ ATPázy. Jedinci trpící tímto syndromem mají červené

krvinky, jež mohou mít zkrácené přežití *in vivo* a mohou trpět mírnou kompenzovanou hemolytickou anémií (Cambot M et al., 2013).



Obr. 5 – Krevní nátěr u syndromu Rh deficiencie. Vlevo - sférocyty, vpravo – stomatocyty. Převzato z (Scordio Teresa, 2016).

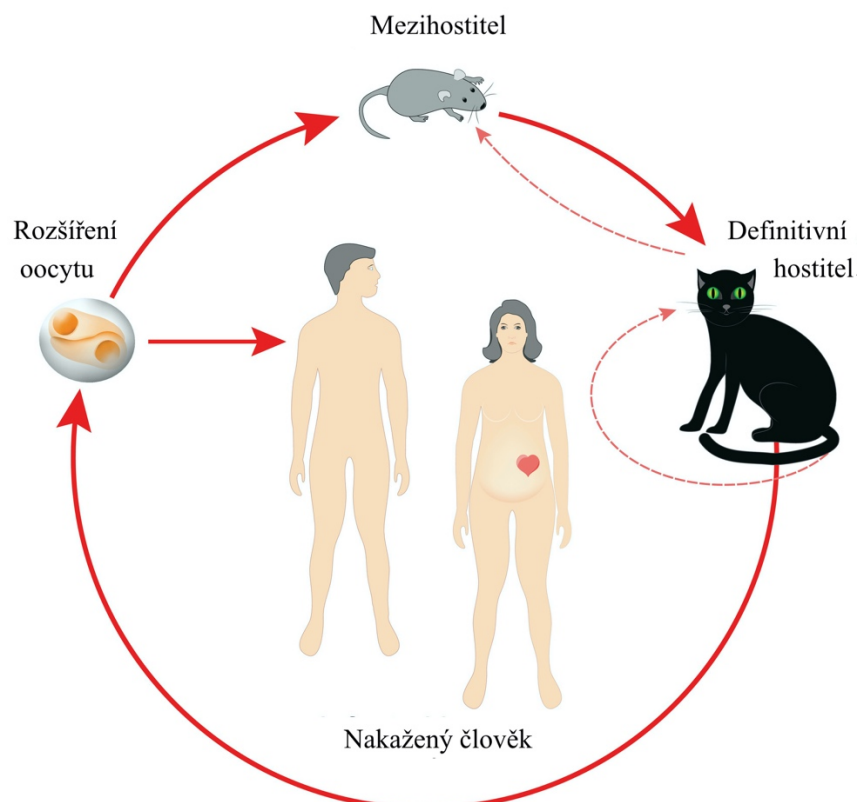
2.4.1 Léčba

Závažnost stavu a možnosti léčby se liší u každého jednotlivce, a je tedy nutno ji přizpůsobit konkrétním potřebám a stavu pacienta. Léčba se obvykle zaměřuje na symptomatickou léčbu, jako je transfuze krve či léčba anémie. Pacienti se syndromem Rh deficiencie vyžadují transfuzi během operací nebo v případech masivního krvácení. Předchozí studie prokázaly, že jedinci s tímto syndromem mají obvykle protilátky anti-Rh29, což činí transfuzi problematickou. Léčba anémie je řešena individuálně podle závažnosti. Mohou být například podány léky, které zvyšují produkci červených krvinek (Shuhong Yu et al., 2017).

2.5 Toxoplazmóza

Toxoplazmóza je celosvětově rozšířené parazitární onemocnění způsobené jednobuněčným obligátním parazitem *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) z rodu *Apicomplexa*. Do rodu *Apicomplexa* patří i další prvoci, jako jsou *Plasmodium sp.* (původci malárie) či *Cryptosporium*, způsobující dětské průjemové onemocnění. *T. gondii* je obligátní intracelulární prvok, který přežívá v buňkách hostitele. Všichni prvoci rodu *Apicomplexa* mají na jednom konci buňky (apikálním konci) jedinečné orgány sloužící k invazi do hostitelské buňky. Parazit *Toxoplasma* má také organelu pocházející z řas - apikoplast, jež je určena pro specifické metabolické funkce, například syntézu mastných kyselin (Halonen et al., 2013).

Životní cyklus *T. gondii* má pohlavní i nepohlavní fázi. Pohlavní životní cyklus, jež je zobrazen na obrázku 6 probíhá u zástupců čeledi *Felinae*, včetně kočky domácí. Ti jsou označováni ze definitivní hostitele *T. gondii*. Ve střevním epitelu kočky se *Toxoplasma* diferencuje na samčí a samičí gametocyty umožňující pohlavní rozmnožování. Kočky s primární infekcí mohou nakonec vylučovat miliony oocytů těchto parazitů, jež obsahují čtyři haploidní sporozoity. Kromě definitivního hostitele může *T. gondii* přirozeně infikovat celou řadu teplokrevných mezihostitelů od ptáků až po hlodavce. U těchto mezihostitelů dochází u parazita k nepohlavní replikaci. Parazité jednoduše replikují svůj haploidní genom a dělí se na dvě buňky dceřiné. Tento proces se nazývá endodygonie a dochází při něm k vytvoření dvou dceřiných buněk uvnitř mateřské buňky, která se nakonec rozpadne, jakmile se dceřiné buňky plně zformují a oddělí. Tachyzoit je rychle se replikující haploidní forma, šířící se po celém hostiteli a na kterou je obvykle zaměřena imunitní odpověď. Tyto speciální formy se ve specifických tkáních a typech buněk přeměňují na bradyzoity. Bradyzoity se vyhýbají imunitní odpovědi, což umožňuje *T. gondii* vytvořit trvalou infekci po celý život hostitele (Kochanowsky JA et al., 2018).



Obr. 6 - Životní cyklus *Toxoplasma gondii*. Převzato z (PharmDr. Štefánia Laca Megyesi, 2023).

Mezi hlavní cesty přenosu infekce *T. gondii* patří konzumace potravy nebo vody kontaminované oocystami vylučovanými kočkami a požití tkáňových cyst ze syrového

nebo nedostatečně tepelně upraveného masa. Kromě toho se u lidí může toxoplasma přenášet z matky na plod, prostřednictvím kontaminovaných transplantovaných orgánů či injekcí infikovaných krevních produktů. Tento organismus je schopen přežít až padesát dní v citované plné krvi při 4 °C. U člověka *T. gondii* vytváří cysty a přetrvává v mozku, v srdečním a kosterním svalstvu. U hlodavců i lidí se nejčastěji tvoří cysty okolo mozku (Nayeri T et al., 2023).

2.5.1 Diagnostika a léčba

U pacientů s toxoplazmózou se často vyskytuje cervikální nebo generalizovaná lymfadenopatie, cerebrální encefalitida a oční toxoplazmóza. Kvůli tomu se provádí biopsie lymfatických uzlin, biopsie mozku a oční biopsie. Barvení tkáně hematoxylinem a eosinem prokazuje parazity *T. gondii* ve zdravých i nekrotických oblastech. Ty byly často zaznamenány blíže krevním cévám, což ukazuje na hematogenní šíření infekce. Přestože biopsie poskytuje definitivní diagnózu, toxoplazmózu lze diagnostikovat i na základě neinvazivního testování, včetně laboratoří a zobrazování. Mezi laboratorní metody patří sérologická vyšetření, jež slouží k určení infekce toxoplasmou pomocí identifikace IgM a IgG protilátek. Protilátky IgM jsou obvykle detekovatelné od pátého dne po infekci, IgG protilátky jsou detekovatelné po jednom až dvou týdnech infekce. Další metodou je molekulární testování DNA pomocí polymerázové řetězové reakce PCR v krvi a jiných tekutinách. Toxoplazmózu je možné také detekovat pomocí radiologické diagnózy. Nálezy počítačové tomografie CT nebo magnetické rezonance MRI ukazují mnohočetné hypodenzní oblasti s prstencovými lézemi v mozku. MRI je upřednostňována před CT pro diagnostiku mozkových lézí u cerebrální toxoplazmózy z důvodu špatného zachycení časných stádií na CT (Madireddy s et al., 2022).

Cílem léčby je omezit množení parazitů při aktivní infekci. Terapeutická léčba je indikována u imunokompetentních jedinců se závažnými nebo dlouhodobými příznaky a u všech imunokompromitovaných pacientů. V případech suspektní infekce *T. gondii* je upřednostňována empirická terapie založená na presumptivní diagnóze před čekáním na výsledky testů. Upřednostňuje se kombinace pyrimethaminu a sulfadiazinu. Počáteční léčba by měla pokračovat po dobu 6 týdnů a po ní by měla následovat chronická udržovací léčba. Kyselina listová je obvykle přidávána do léčebného režimu, aby se zabránilo nedostatku kyseliny listové způsobené sulfadiazinem. Taktéž se přidávají steroidy ke standardnímu režimu k léčbě pacientů s mozkovým edémem a oční toxoplazmózou. Terapeutický management

toxoplazmózy zahrnuje také zahájení antiretrovirové terapie pro imunitní rekonstrukci, obvykle do dvou týdnů od zahájení léčby anti-toxoplazmózy (Zoubi MA et al., 2017).

2.5.2 Souvislost toxoplazmózy s Rh faktorem

Jedna z důležitých studií byla publikována v roce 2008 skupinou vědců Novotná et al. (2008), kdy byla zkoumána možná souvislost mezi fenotypem Rh (nebo genotypem Rh) a zhoršením psychomotorické výkonnosti (reakčních časů) spojených s toxoplazmózou u čtyř nesourodých populací. Reakční čas byl měřen pomocí dvou počítačových verzí jednoduchého testu reakčního času. Principem byla reakce na objevení bílého čtverce uprostřed černého displeje. Dalším způsobem testování byly sérologické testy. Tyto sérologické testy na toxoplazmózu byly provedeny v Národní referenční laboratoři pro toxoplazmózu Státního zdravotního ústavu v Praze. Titry specifických protilátek IgG a IgM pro toxoplazmózu byly stanoveny metodou ELISA optimalizovanou pro detekci akutní toxoplazmózy. Pro vyšetření Rh faktoru byla použita standardní aglutinační metoda. Konstantní množství anti-Rh séra bylo přidáno do kapky krve na bílé skleněné desce, červené krvinky Rh pozitivních subjektů byly aglutinovány během 2 až 5 minut (Flegr J et al., 2018).

K odhalení rozdílů v reakčních časech mezi Rh homozygoty a Rh heterozygoty bylo nutno zopakovat studii ve větším rozsahu. Výsledky studie vykazaly vliv interakce Rh s toxoplazmózou. V skupině Rh negativních mužů byly reakční časy výrazně delší. V podskupině Rh pozitivních osob nebyl vliv infekce způsobené mikroorganismem *Toxoplasma gondii* významný v žádné minutě testu. Srovnání průměrných reakčních časů mezi infikovanými ukazuje, že ochranný vliv RhD genotypu na změny reakčního času vyvolané *T. gondii* je poměrně silný. Bylo také prokázáno, že pozitivní heterozygoti jsou rezistentní vůči fyziologickým účinkům toxoplazmózy a Rh pozitivní homozygoti jsou pouze přechodně chráněni před některými negativními účinky toxoplazmózy (Novotná M et al., 2008).

Kdežto novější publikovaná studie relativizovala studii uvedenou výše a dospěla k závěru, že infekce *T. gondii* není spojena s krevními skupinami AB0 a Rh. Bylo testováno přes dva tisíce občanů v mexickém městě Durango. Každému účastníku byl odebrán vzorek krve a pomocí komerčně dostupných souprav byl testován na krevní skupiny AB0 a Rh. Vzorky krve byly odstředěny a získané sérum bylo následně testováno na přítomnost anti-*T. gondii* IgG protilátek pomocí enzymové imunoanalytické soupravy. Výsledky byly upraveny podle sociodemografických proměnných včetně věku, pohlaví, místa narození, oblasti bydliště, vzdělání a socioekonomického statusu. Jedinci s Rh pozitivní a Rh negativní

krevní skupinou měli podobnou frekvenci hodnot hladin protilátek anti-*T. gondii* IgG. Výsledky této studie nepotvrzují souvislost mezi séropozitivitou *T.gondii* a krevními skupinami ABO a Rh (Pérez-Álamos AR et al., 2024).

Za účelem prozkoumání vědeckých důkazů týkajících se možné souvislosti mezi Rh faktorem a infekcí *T. gondii* byl proveden systematický výzkum a metaanalýza. Tyto průřezové studie byly provedeny v osmi zemích (Česká republika, Írák, Írán, Egypt, Alžírsko, Tunisko a Pobřeží slonoviny) a bylo do ní zařazeno celkem jedenadvacet článků týkajících se séroprevalence infekce *T. gondii* v krevních skupinách Rh. Protilátky proti mikroorganismu *T. gondii* byly stanoveny pomocí metody ELISA, pomocí komplementu fixačního testu CFT, enzymové imunoanalýzy EIA, latexového aglutinačního testu LAT a nepřímé imunofluorescenční analýzy IFA. Metaanalýzy se zúčastnilo více než deset tisíc osob s Rh pozitivní nebo negativní krevní skupinou. Hlavní limitací studií zahrnutých do této metaanalýzy je skutečnost, že účastníci byli vyšetřováni pouze na Rh fenotyp a ne na Rh genotyp. Stanovení Rh fenotypu je velmi snadné a finančně dostupné pomocí standardní aglutinační techniky. Ke stanovení Rh genotypu je však třeba použít mnohem sofistikovanější a dražší techniku. Mimo to byla také v tomto systematickém přehledu zaznamenána vysoká heterogenita. Zdrojem heterogenity jsou rozdíly v genetickém potenciálu cílové populace, který je ovlivněn životním stylem a enviromentálními faktory, jako jsou stravovací návyky, znečištění životního prostředí, expozice ultrafialového záření, typy infekcí a socioekonomické faktory. Mezi další zdroj heterogenity patří také věk. Stáří zvyšuje možnost expozice *T. gondii*. Výsledky této studie ukázaly na neexistující statisticky významný rozdíl mezi prevalencí infekce toxoplazmou u Rh pozitivních a Rh negativních osob, prevalence je vysoká u obou krevních skupin. Vzhledem k malému počtu studií, jež se přímo zabývaly vztahem mezi toxoplazmózou a Rh faktorem, může v budoucnu vést větší množství kvalitnějších studií a lepšímu poznání objasňujícímu možný vztah mezi toxoplazmózou a Rh krevní skupinou (Nayeri T et al., 2023).

2.6 *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori (*H. pylori*) je spirálovitá mikroaerobní gramnegativní bakterie, která kolonizuje lidský žaludek a dvanáctník. Snímek bakterie *H. pylori* z elektronového mikroskopu je zobrazen na obrázku 7.



Obr. 7 – Mikrofotografie bakterie *Helicobacter pylori* z elektronového mikroskopu.
Převzato z (W. John Spicer, 2009).

Postihuje více než polovinu lidské populace. Infekce se může objevit již v dětství a přetrvává celý život. Dostupné studie ukázaly, že *H. pylori* vede k některým důležitým gastrointestinálním onemocněním, jako je například chronická gastritida, peptické vředy, žaludeční adenokarcinom či například lymfom lymfoidní tkáně sliznice. Rakovina žaludku je celosvětově pátou nejčastější rakovinou a třetí nejčastější příčinou smrti. Infekce byla také spojována s řadou parenterálních onemocnění, jako například s idiopatickou trombocytopenickou purpurou. Mikroorganismus je přenášen vertikálně či horizontálně z člověka na člověka, a to v rámci rodin nebo vystavením kontaminaci životního prostředí. Je také známo, že může dojít k přenosu organismu mezi sexuálními partnery (Sun Y et al., 2019).

Bakterie *H. pylori* má několik virulentních faktorů včetně ureázy, proteinů vnější membrány, genu A asociovaného s cytotoxinem (*cagA*), vakuolizujícího genu cytotoxinu A (*vacA*), adhezinu vázajícího antigen krevní skupiny (BaBA) a vnějšího zánětlivého proteinu (OipA). Z těchto faktorů virulence jsou nejčastěji identifikovány geny *cagA* a *vacA*. CagA je silný bakteriální toxin, který je spojován s gastritidou a rakovinou žaludku. Gen *cagA* je lokalizován na patogenetickém ostrově *cag*, který produkuje sekreční systém 4. typu. Protein *cagA* proniká do hostitelských buněk prostřednictvím tohoto systému, což vede k indukci produkce cytokinů. Gen *cagA* tak může způsobit značný zánět a závažnou infekci v gastrointestinálním systému (Khosravi AD et al., 2021).

Pro povrchovou adherenci musí mít kmen bakterie ureázu a bičík. Ureáza metabolizuje močovinu na oxid uhličitý a amoniak, který vyrovnává žaludeční šťávy. Bičíky poté umožňují bakterii plavat přes viskózní žaludeční hlen a dosáhnou neutrálnějšího pH. Jakmile se bakterie

dostane pod hlen, pevně přilne k podkladovým buňkám. Na tomto procesu se podílí několik epiteliálních struktur včetně lipidů, gangliosidů a sulfátových sacharidů. Na přilnutí k buňkám se také podílejí adheziny, jež se vážou na epitel. Nejvíce charakterizovaným adhezinem *H. pylori* je adhezin vázající antigen krevní skupiny BaBA, který převažuje u kmenů typu 1. BaBA protein se váže na receptory na povrchových buňkách žaludeční sliznice člověka, které obsahují fukózu (Moulds, Joann M et al., 2000).

K identifikaci infekcí *H. pylori* se používá několik diagnostických metod, mezi které patří endoskopie a kultivace s následnou histopatologií nebo různými molekulárními a amplifikačními testy nukleových kyselin. Dále také neinvazivní metody, jako například močovinové dechové testy, testy fekálního antigenu a sérologické testy. Tyto neinvazivní metody jsou nejvíce používány, z důvodu své jednoduchosti, rychlosti, cenové dostupnosti a pohodlnosti. Je také doporučováno pro účely epidemiologického výzkumu používat sérologické testy, jako je screening protilátek sérového imunoglobulinu G metodou ELISA (Khosravi AD et al., 2021).

2.6.1 Léčba

Léčba infekce spočívá v kombinaci antimikrobiálních činidel a antisekrečních činidel, přičemž pro baktericidní účinek antimikrobiálních činidel je vyžadováno zvýšení pH žaludku antisekrečními činidly. Existuje možnost použít také alternativní metody ke zlepšení eradikace *H. pylori*, fyto medicína a probiotika, ačkoli mechanismu účinku ještě není zcela jasný. Účinek antimikrobiálních látek a antisekrečních látek závisí nejen na jejich farmakologických aktivitách, ale také na jejich farmakokinetických vlastnostech. Mnoho antimikrobiálních činidel, včetně amoxicilinu, klarithromycinu, levofloxacinu, metronidazolu, tetracyklinu, rifabutinu a sloučenin obsahujících vizmut, bylo použito pro terapii *H. pylori*. Hlavní používaná antisekreční činidla jsou inhibitory protonové pumpy PPI (Yang JC et al., 2014).

2.6.2 Souvislost s Rh faktorem a krevními skupinami

K rizikových faktorů patří kromě těhotenství a kouření také krevní skupiny a Rh faktor. Bylo provedeno několik důležitých studií, ze kterých bylo patrné, že jedinci s krevní skupinou 0 Rh⁺ mají vyšší pravděpodobnost infekce *H. pylori*.

Základní mechanismus pro vztah mezi krevní skupinou AB0 a *H. pylori* infekce byla navržena pomocí předchozích biochemických studií. Jedinci krevní skupiny 0 nesoucí fenotyp sekretor přeměňují prekurzor oligosacharidu typu 1 na antigen H typu 1. Ovšem kvůli absenci glykosyltransferázy A (GTA) nebo glykosyltransferázy B (GTB) nejsou schopni syntetizovat

antigeny A nebo B. Proto u Lewis pozitivních jedinců přeměňují antigen H typu 1 na antigen Le^b. Je pravděpodobné, že vysoká kvantitativní exprese tohoto antigenu ve sliznici žaludku a dvanáctníku u jedinců s krevní skupinou 0 zvyšuje náchylnost k infekci *H. pylori* tím, že poskytuje větší počet receptorů pro tento mikroorganismus (Chakrani Z et al., 2018). K dalším mechanismům patří, že subjekty s krevní skupinou 0 mají tendenci produkovat více pleiotropního prozánětlivého cytokinu interleukinu-6. To nejen podporuje adhezi bakterií, ale také podporuje diferenciaci T helper 2 buněk a zároveň inhibuje T helper 1 buňky. Tím se poměr T helper 1/ T helper 2 zvyšuje. Tento projev je běžně pozorován u pacientů s duodenálním vředem. Mechanismus týkající se Rh faktoru je nadále potřeba vyvíjet, je ovšem jasné, že Rh pozitivní jedinci mají vyšší pravděpodobnost infekce *H. pylori* (Gasim GI et al., 2017).

Jako další rizikový faktor je považováno těhotenství. Již dříve bylo zjištěno, že těhotné ženy s krevní skupinou 0 byly vystaveny vyššímu riziku infekce malárie a vyššímu riziku preeklampsie. Studie ukázaly, že existuje silná závislost mezi krevní skupinou 0 Rh+ u těhotných žen a infekce *H. pylori*. Taková souvislost by měla zvýšit index podezření na infekci *H. pylori* u těhotných žen s dyspepsií, zejména v zemích s vysokou prevalencí této choroby (Gasim GI et al., 2017).

2.7 Horší zdravotní stav a vyšší výskyt poruch u Rh negativních jedinců

Cílem jedné ze studií bylo vyhledat index validity zhoršeného zdravotního stavu Rh negativních subjektů. V posledních letech několik studií prokázalo, že Rh pozitivní a Rh negativní jedinci se liší v odolnosti vůči nepříznivým účinkům parazitárních infekcí, stárnutí, únavě či kouření. Výsledky předchozích studií naznačují, že Rh negativní jedinci by mohli mít horší zdravotní stav než Rh pozitivní populace. Tyto výsledky však byly získány buď na malých, spíše specifických populacích, například na vojenském personálu či těhotných ženách (Kaňková Š et al., 2010).

Byl vypracován anamnestický dotazník skupinou vědců Flegr J et al. (2015), který byl distribuován v české i anglické verzi. Obsahoval dvě kategorie otázek. První z nich sledovala přítomnost a intenzitu obecných i specifických zdravotních problémů respondentů. Respondenti byli požádáni o ohodnocení alergie, zažívacích problémů, plodnosti, urogenitálních, srdečních, hematologických, imunitních, neurologických, duševních, dýchacích či sexuálních problémů. Druhá skupina otázek byla určena k získání objektivních informací odrážejících zdravotní stav respondentů. Před statistickou analýzou byla odfiltrována podezřelá

data. V testu byly dále měřeny reakční časy, krátkodobá a dlouhodobá paměť, psychomotorická výkonnost, inteligence a osobnostní profily (Flegr J et al., 2015).

Po hodnocení Rh negativní subjekty vykazovaly mnoho ukazatelů horšího zdravotního stavu. Například Rh negativní muži častěji uváděli některé poruchy duševního zdraví, včetně panických poruch, poruch pozornosti, problémy s imunitou, alergií, zejména kožních. Mezi další problémy Rh negativních jedinců patří anémie, osteoporóza, onemocnění jater, infekční onemocnění a akutní průjmová onemocnění. Oproti tomu Rh negativní ženy uváděly častěji lupénku, ischemická onemocnění, diabetes 2. typu, některé typy rakoviny, otoky lymfatických uzlin, nedostatek vitamínu B, trombózu, infekce močových cest či skoliózu. Výsledky následně ukazovaly, že Rh negativní jedinci museli častěji navštěvovat zdravotníky se specializací na otorinolaryngologii, psychiatrii, gynekologii a dermatologii (Flegr J et al., 2015).

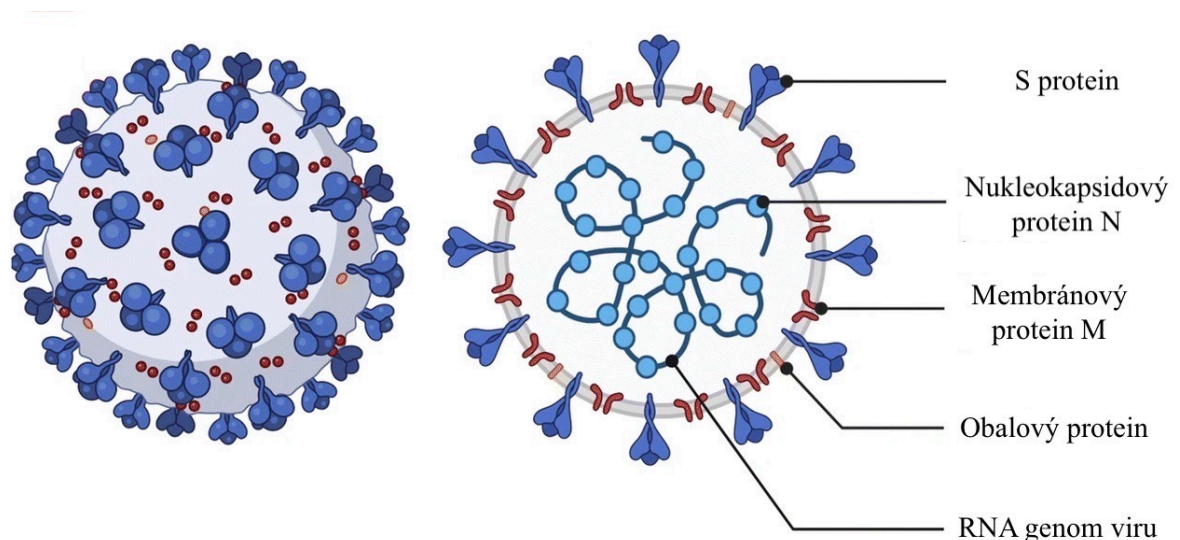
Mechanismus vlivu Rh faktoru na zdravotní stav člověka ovšem není jasný. RhD protein společně se silně homologním RhCE proteinem a homologním RhAG glykoproteinem jsou složky membránového komplexu, jehož funkce není zcela jasná. S největší pravděpodobností se podílí na transportu NH_3 a možná i na transportu CO_2 (Kustu S et al., 2006). Tento komplex je spojen s cytoskeletem na bázi spektrinu a proto hraje důležitou roli při udržování typického bikonkávního tvaru lidských erytrocytů. Biologické funkce komplexů obsahujících RhD protein nejsou doposud zcela známy. Mohou se však podílet na detoxikaci $\text{NH}_3 / \text{NH}_4^+$. Amoniak, produkt proteinového katabolismu, je extrémně toxický zejména pro mozkové buňky, a musí být rychle odstraněn z citlivých orgánů. Bylo vyzorováno, že koncentrace amoniaku v červených krvinkách je třikrát vyšší než v plazmě. Dále se předpokládá, že komplex obsahující RhD hraje klíčovou roli při zachycování a transportu amoniaku do ledvin a jater. Komplex by se rovněž mohl podílet na regulaci intracelulárního pH a následně také na regulaci lokální tenze kyslíku (Van Kim CL et al., 2006). Předpokládá se, že nepřítomnost kyslíku spojená s Rh negativitou v určitých částech nervového systému by mohla být zodpovědná za fyziologické, ale i behaviorální účinky fenotypu RhD. Kolísání tenze kyslíku v různých orgánech a tkáních by samozřejmě mohlo ovlivňovat i další biologické funkce, včetně funkcí imunitního systému. To by mohlo vysvětlit asociaci Rh negativity a neurologických, psychických a imunologických poruch. Pravděpodobná role komplexu obsahujícího RhD při udržování normální morfologie a adhezivitu červených krvinek by mohla být příčinou pozorovaných souvislostí Rh negativity s některými hematologickými a zánětlivými onemocněními, včetně artritidy (Flegr J et al., 2015).

3 Rh faktor a onemocnění COVID-19

Krevní skupiny AB0 a Rh faktor jsou dva rizikové faktory, které hrají důležitou roli v náchylnosti a výsledcích infekce COVID-19. Dle vyhlášení Světové zdravotnické organizace (WHO) v březnu 2020 se koncem prosince 2019 objevilo koronavirové onemocnění (COVID-19). Toto onemocnění je způsobeno novým koronavirem těžkého akutního respiračního syndromu SARS-CoV-2, které způsobilo globální pandemii (Abuawwad MT et al.,2023).

3.1 COVID-19

Genom SARS-CoV-2 obsahuje jednovláknovou ribonukleovou kyselinu (RNA) zapouzdřenou v membránovém obalu o průměru 75-150 nm. Obal je pokryt glykoproteinovými hroty, které koronavirům dodávají vzhled podobný koruně, což se také vyskytlo v názvu. Genom SARS-CoV-2 má délku přibližně třicet tisíc nukleotidů. Jak můžeme vidět na obrázku 8, na virovém genomu SARS-CoV-2 jsou kódovány čtyři hlavní struktury proteinu, a to glykoprotein na povrchu hrotu S, membránový protein M, obalový protein E a nukleokapsidový protein N (Majumder J et al.,2023).



Obr. 8 - Struktura viru Sars-CoV-2. Převzato z (Majumder J et al.,2023).

Replikace viru Sars-CoV-2 vyžaduje hostitelskou buňku a obvykle zahrnuje fáze připojení, penetrace, rozbalení, replikace, sestavení a uvolnění. Hrotový glykoprotein na povrchu viru Sars-CoV-2 se váže na protein receptoru pro angiotenzin konvertující

enzym 2 (ACE2) umístěný na plazmatické membráně hostitelské buňky a usnadňující invazi do hostitelské buňky. Po receptorem zprostředkované endocytóze viru do hostitelské buňky se uvolní virový genom v podobě jednořetězcové pozitivní RNA. Pomocí hostitelského ribozomu se virový genom přeloží na virové polyproteiny. Genová replikace pak syntetizuje virový genom a transkripční s následnou translací vznikají čtyři základní strukturní virové proteiny (N, S, M a E). Protein N váže genomovou RNA, zatímco proteiny S, M a E jsou integrovány do membrány endoplazmatického retikula. Vytvářejí tak endoplazmatické retikulum – Golgiho meziprostor, označovaný také jako vezikulárně-tubulární klastr. Sestavený nukleokapsid se spirálovitě stočenou RNA je zapouzdřen do lumen endoplazmatického retikula. Virové potomstvo je transportováno směrem k plazmatické membráně hostitelské buňky a nakonec je dceřiný virus uvolněn exocytózou (Chilamakuri R et al., 2021).

3.2 Metody a techniky diagnostiky COVID-19

Byly vyvinuty různé diagnostické metody pro detekci virového onemocnění COVID-19. Obecně mezi tyto metody patří molekulární testy, založené na technikách detekující virový genomický materiál, testy na bázi antigenů a protilátek detekujících proteiny, CT vyšetření kontrolující plíce pacienta či další rychlé testy, jako například biosenzory. Dominantní metodou kontroly COVID-19 se staly PCR testy, jež detekují různé oblasti genomu viru SARS-CoV-2 (Rong G et al., 2022).

PCR testy využívají technologii amplifikace DNA, která se opírá o enzymatickou aktivitu DNA polymerázy. DNA polymeráza umožní množení požadovaného genového fragmentu. Detekce koronavirů vyžaduje nejprve krok reverzní transkripce, který převede virovou RNA na komplementární DNA (cDNA). Druhým krokem je amplifikace PCR umožňující kvantitativní detekci fluorescenční reakce pomocí specifických přístrojů. K dispozici jsou dvě metody provádění RT-PCR, neboli PCR s reverzní transkripcí, která se stala rutinní metodou k detekci koronavirů s vysokou citlivostí, specifičností a širokou škálou použití (Wang B et al., 2021).

První metodou je jednokrokový test, při němž se v jediné reakci provádí syntéza cDNA i amplifikace, což minimalizuje experimentální chyby. Jednokrokový test však není vhodný pro vícenásobné testování stejného vzorku, jelikož RNA sloužící jako templát snadno a rychle degraduje. Druhou metodou je dvoukrokový test, který je oproti jednokrokovému citlivější díky oddělené probíhající transkripci. Tato technika ovšem zvyšuje riziko kontaminace DNA a také vyžaduje více času (Rong G et al., 2022).

Při klinické detekci se po celém světě navrhovaly diagnostické soupravy RT-PCR tak, aby se snížila míra falešně negativních výsledků. Falešně negativní výsledky mohou být výsledkem mutací genomu viru SARS-CoV-2, které ovlivňují cílovou oblast primerů a sond. Výsledné neshody mezi primery nebo sondami a cílovou sekvencí snižují účinnost testu a mohou generovat falešně negativní výsledky. Tomu se lze do určité míry vyhnout použitím vícenásobné amplifikace cílových genů, ovšem specifita a citlivost testu nemusí být dostatečná k definitivnímu vyřešení tohoto problému (Wang B et al., 2021).

Přestože je RT-PCR zlatým standardem pro detekci onemocnění COVID-19, předpokládá se, že má nízkou citlivost zejména v časných stádiích onemocnění. K diagnostice pacientů s podezřením na infekci COVID-19 je hojně využívána detekce CT hrudníku. Jedná se o neinvazivní metodu založenou na několika rentgenových detekcích prováděných na hrudníku pacienta v různých úhlech za účelem vytvoření příčných řezů. Tyto snímky jsou poté analyzovány lékaři s cílem nalezení abnormálních rysů a stanovení diagnózy. Dle dostupných studií je evidentní, že pacienti s onemocněním COVID-19 mají na CT snímcích hrudníku typické radiologické nálezy. Mezi nejdůležitější patří lobární konsolidace, izolovaný pleurální výpotek, jednostranné postižení a postižení horní zóny plic. Tyto zobrazovací techniky jsou určeny také stádiem infekce (Esref Arac et al., 2020).

3.4 Souvislost krevních skupin s onemocněním COVID-19

Od vypuknutí pandemie bylo provedeno mnoho studií, které osvětlily molekulární mechanismy vysvětlující interakci SARS-CoV-2 s hostitelskými buňkami. Vstup virové částice je zprostředkován vazbou proteinu S viru vznikajícího z virového obalu na receptory ACE2, které jsou přítomny na několika lidských buňkách. Antigeny krevních skupin, které jsou určeny oligosacharidy, fugují jako receptory pro několik mikroorganismů, a to včetně koronavirů (Taha SAH et al., 2020).

Bylo navrženo několik základních mechanismů vysvětlujících souvislost mezi krevní skupinou AB0 a virem SARS-CoV-2. Protilátky anti-A, které jsou přítomny u jedinců s krevními skupinami 0 a B vykazují částečnou nebo úplnou ochranu viru. Zatímco jedinci s krevní skupinou A mají vyšší riziko infekce, protože jim chybí protilátky anti-A. Dále bylo zjištěno, že krevní skupina A má zvýšenou hladinu ACE2, který hraje významnou roli v podpoře zánětlivé reakce. Z toho vyplývá, že krevní skupiny 0 mají nižší hladinu ACE2 a vyšší ochranu proti viru. Pokud jde o závažnost infekce, bylo zjištěno, že pacienti s krevní skupinou A a AB mají zvýšené hladiny D-dimerů, což může mít

význam pro rozvoj závažných respiračních projevů při infekci. Krevní skupiny 0 a B mají také navíc snížené hladiny faktorů VIII a von Willebrandova faktoru. Snížené hladiny těchto faktorů zajišťují ochranné mechanismy proti komplikacím způsobeným SARS-CoV-2. Mezi zmíněné komplikace patří například plicní vaskulopatie (Abuawwad MT et al., 2023).

3.3 Souvislost Rh faktoru s onemocněním COVID-19

Rh fenotypy jsou ve srovnání s AB0 krevními skupinami spojovány s menším počtem onemocnění. Ostatně jako AB0 je i typ Rh důležitý z hlediska typové kompatibility a imunitní odpovědi. Dle některých studií bylo zjištěno, že Rh negativní jedinci měli nižší riziko počáteční infekce v porovnání s Rh pozitivními jedinci. U Rh pozitivních jedinců byla také prokázána vyšší pravděpodobnost pozitivního testu na SARS-CoV-2. Z dostupných studií lze říci, že Rh negativní krevní skupina je spojena s nižším rizikem rozvoje závažné infekce COVID-19 a s nižším rizikem intubace a úmrtí (Abuawwad MT et al., 2023).

Mechanismy které stojí za touto ochranou či náchylností nejsou zatím dostatečně jasné. Ovšem jedna z hypotéz předpokládá, že glykolysované struktury přítomné různě na povrchu erytrocytů usnadňují vazbu viru nebo slouží jako jeho receptory či koreceptory prostřednictvím interakcí glykan-glykan nebo lektin-glykan v interakci podobné suchému zipu. Přírodní protilátky však mohou blokovat nebo opsonizovat vstup virových částic, což vede k neutralizaci zprostředkovanou komplementem. Rovněž bylo zjištěno, že přírodní protilátky mohou napomáhat tvorbě cytotoxických T-buněk proti patogenu. U výše zmíněných mechanismů je zřejmé, že virové infekce vykazují afinitu k některým krevním skupinám nebo mohou mít ochranný charakter. Ve většině studií byl velkým problémem nízký počet případů způsobený vysokou falešnou negativitou výsledků PCR a nedosažení všech výsledků PCR v důsledku některých omezení (Esref Arac et al. 2020). Je také nutno zdůraznit, že spojení mezi krevními skupinami (AB0 a RhD) a COVID-19 bude pravděpodobně také založeno na mnoha ostatních faktorech, včetně etnického původu, zeměpisné polohy či expozice nakažených pacientů (Majeed KR et al., 2021).

Další velmi zajímavá studie zkoumala vliv Rh faktoru na neurologické komplikace u lidí infikovaných infekcí COVID-19. Zaměřuje se na interakce mezi Rh faktorem, krevními skupinami a COVID-19 a na to, jak tyto faktory mohou ovlivnit neurologické příznaky jako jsou ztráta čichu, ztráta chuti či mrtvice. Rh faktor, konkrétně přítomnost nebo absence Rh antigenu, může výrazně ovlivnit T-buněčné reakce během infekce COVID-19. Studie ukazují, že osoby Rh pozitivní mohou mít odlišné imunitní reakce ve srovnání s jedinci Rh negativními.

Tento rozdíl může mít významný dopad na průběh onemocnění a na riziko vzniku neurologických komplikací. Mechanismus, kterým Rh faktor ovlivňuje neurologické komplikace při infekci COVID-19 zahrnuje několik klíčových interakcí mezi imunitním systémem a virovými proteiny. Infekce může pronikat do centrálního nervového systému (CNS) prostřednictvím infikovaných endotelových buněk a může vést k různým neurologickým onemocněním, jako je cévní mozková příhoda, vaskulární poruchy a encefalitida. CD8+ T-lymfocyty v perivaskulární oblasti mozku naznačují, že T-buněčné odpovědi hrají roli v těchto komplikacích, přičemž Rh pozitivní jedinci mohou mít zvýšenou rychlost virové replikace kvůli snížené indukci CD8+ T-buněk. Změněná glykolysace a enzymatická nestabilita způsobená Rh faktorem mohou dále modulovat imunitní odpověď, což vede k vyššímu riziku infekce a autoimunitních reakcí v CNS. Rh pozitivní jedinci mají vyšší riziko infekce a následných neurologických komplikací kvůli antigenní variabilitě, která ovlivňuje tvorbu autoimunitních reakcí a zánětů. Tento proces může způsobit symptomy jako je ztráta čichu, poruchy chuti a cévní mozkové příhody. Rh negativní jedinci tak mohou mít sníženou interakci mezi virovými proteiny a specifickými proteiny na periferních nervech, což vede k nižší pravděpodobnosti neurologických komplikací. Rh faktor tak může sloužit jako prognostický marker pro neurologické symptomy spojené s onemocněním COVID-19 (Abdel-Wahab et al., 2022).

ZÁVĚR

Rh faktor je velice důležitý fenomén dnešní medicíny díky jeho významu při krevních transfuzích a těhotenství.

Tato práce popisuje obecné vlastnosti a funkci Rh systému. Sledovala ale především komplikace spojené s Rh inkompatibilitou, zejména hemolytickou nemoc novorozenců. Díky pokrokům v diagnostice a prevenci, jako je použití anti-D gamaglobulinu, se podařilo výrazně snížit výskyt této nemoci. Přesto je nezbytné pokračovat ve výzkumu, aby se rizika dále minimalizovala.

Kromě hemolytické nemoci novorozenců byly v této práci diskutovány i další komplikace, jako jsou autoimunitní hemolytické anémie a hemolytické transfuzní reakce. Výzkum rovněž poukázal na možné souvislosti mezi Rh faktorem a infekčními nemocemi způsobené bakterií *H. pylori*, parazitem *T. gondii* a infekcí COVID-19, což otevírá nové směry pro budoucí výzkum.

POUŽITÁ LITERATURA

- 1) Abdel-Wahab, Tamer Ibrahim, et al. "Does the Rh Factor Induce Neurological Complications When Humans Are Infected with COVID-19." *NeuroQuantology* 20.16 (2022): 4541-4555. doi : 10.48047/NQ.2022.20.16.NQ880461.
- 2) Abuawwad MT, Taha MJJ, Abu-Ismael L, Alrubasy WA, Sameer SK, Abuawwad IT, Al-Bustanji Y, Nashwan AJ. Effects of ABO blood groups and RH-factor on COVID-19 transmission, course and outcome: A review. *Front Med (Lausanne)*. 2023 Jan 12;9:1045060. doi: 10.3389/fmed.2022.1045060.
- 3) Avent ND, Reid ME. The Rh blood group system: a review. *Blood*. 2000 Jan 15;95(2):375-87. Erratum in: *Blood* 2000 Apr 1;95(7):2197. doi: 10.1182/blood.V95.2.375.
- 4) Bass GF, Tuscano ET, Tuscano JM. Diagnosis and classification of autoimmune hemolytic anemia. *Autoimmun Rev*. 2014 Apr-May;13(4-5):560-4. doi: 10.1016/j.autrev.2013.11.010.
- 5) Cambot M, Mazurier C, Canoui-Poitaine F, Hebert N, Picot J, Clay D, Picard V, Ripoche P, Douay L, Dubart-Kupperschmitt A, Cartron JP. In vitro generated Rh(null) red cells recapitulate the in vivo deficiency: a model for rare blood group phenotypes and erythroid membrane disorders. *Am J Hematol*. 2013 May;88(5):343-9. doi: 10.1002/ajh.23414.
- 6) Čermák J, Písačka M. Autoimmune hemolytic anemia. *Vnitr Lek*. 2018 Summer;64(5):514-519. English. doi: 10.36290/vnl.2018.072.
- 7) de Haas M, Thurik FF, Koelewijn JM, van der Schoot CE. Haemolytic disease of the fetus and newborn. *Vox Sang*. 2015 Aug;109(2):99-113. doi: 10.1111/vox.12265.
- 8) de Winter DP, Kaminski A, Tjoa ML, Oepkes D, Lopriore E. Hemolytic disease of the fetus and newborn: rapid review of postnatal care and outcomes. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2023 Oct 18;23(1):738. doi: 10.1186/s12884-023-06061-y.
- 9) Dean L. Blood Groups and Red Cell Antigens [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2005. Chapter 5, The ABO blood group. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2267/>. ISBN: 9781932811056.
- 10) Despotovic JM, Kim TO. Cold AIHA and the best treatment strategies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2022 Dec 9;2022(1):90-95. doi: 10.1182/hematology.2022000369.

- 11) Esref, ARAC., et al. "Association between the Rh blood group and the Covid-19 susceptibility." *International Journal of Hematology and Oncology* 33.1 (2020): 081-086. doi: 10.4999/uhod.204247 .
- 12) Flegel WA. The genetics of the Rhesus blood group system. *Blood Transfus.* 2007 Apr;5(2):50-7. doi: 10.2450/2007.0011-07.
- 13) Flegr J, Hoffmann R, Dammann M (2015) Worse Health Status and Higher Incidence of Health Disorders in Rhesus Negative Subjects. *PLOS ONE* 10(10): e0141362. doi: 10.1371/journal.pone.0141362.
- 14) Flegr J, Milinski M, Kaňková Š, Hůla M, Hlaváčová J, Sýkorová K. Latent toxoplasmosis and olfactory functions of Rh positive and Rh negative subjects. *PLoS One.* 2018 Dec 27;13(12):e0209773. doi: 10.1371/journal.pone.0209773.
- 15) Gasim GI, Elmugabil A, Hamdan HZ, Rayis DA, Adam I. O Blood Group as a Risk Factor for *Helicobacter Pylori* IgG Seropositivity Among Pregnant Sudanese Women. *Clin Pract.* 2017 Jun 7;7(3):958. doi: 10.4081/cp.2017.958.
- 16) Halonen SK, Weiss LM. Toxoplasmosis. *Handb Clin Neurol.* 2013;114:125-45. doi: 10.1016/B978-0-444-53490-3.00008-X.
- 17) Harmening, Denise M., Glenda Forneris, and B. J. Tubby. "The ABO blood group system." *Modern Blood Banking & Amp; Transfusion Practices.* 6th ed. Philadelphia: FA Davis Company(2012). ISBN: 0803626827.
- 18) Hillyer, Christopher D., et al. *Blood banking and transfusion medicine: Basic principles and practice.* Elsevier Health Sciences, 2006. ISBN: 9780443069819.
- 19) Chakrani Z, Robinson K, Taye B. Association Between ABO Blood Groups and *Helicobacter pylori* Infection: A Meta-Analysis. *Sci Rep.* 2018 Dec 4;8(1):17604. doi: 10.1038/s41598-018-36006-x.
- 20) Chilamakuri R, Agarwal S. COVID-19: Characteristics and Therapeutics. *Cells.* 2021 Jan 21;10(2):206. doi: 10.3390/cells10020206.
- 21) Jäger, Ulrich, et al. "Diagnosis and treatment of autoimmune hemolytic anemia in adults: Recommendations from the First International Consensus Meeting." *Blood reviews* 41 (2020): 100648. doi: 10.1016/j.blre.2019.100648.
- 22) Janda A, Engel C, Remppis J, Enkel S, Peter A, Hörber S, Ganzenmueller T, Schober S, Weinstock C, Jacobsen EM, Fabricius D, Zernickel M, Stamminger T, Dietz A, Groß HJ, Bode SFN, Haddad ADM, Elling R, Stich M, Tönshoff B, Henneke P, Debatin KM, Franz AR, Renk H. Role of ABO Blood Group in SARS-CoV-2 Infection in

- Households. *Front Microbiol.* 2022 May 6;13:857965. doi: 10.3389/fmicb.2022.857965.
- 23) Kaňková Š, Šulc J, Flegr J (2010) Increased pregnancy weight gain in women with latent toxoplasmosis and RhD-positivity protection against this effect. *Parasitology* 137: 1773–1779. doi: 10.1017/S0031182010000661.
- 24) Khosravi AD, Sirous M, Saki M, Seyed-Mohammadi S, Modares Mousavi SR, Veisi H, Abbasinezhad Poor A. Associations between seroprevalence of *Helicobacter pylori* and ABO/rhesus blood group antigens in healthy blood donors in southwest Iran. *J Int Med Res.* 2021 Dec;49(12):3000605211058870. doi: 10.1177/03000605211058870.
- 25) Kochanowsky JA, Koshy AA. *Toxoplasma gondii*. *Curr Biol.* 2018 Jul 23;28(14):R770-R771. doi: 10.1016/j.cub.2018.05.035.
- 26) Kustu S, Inwood W. Biological gas channels for NH₃ and CO₂: evidence that Rh (Rhesus) proteins are CO₂ channels. *Transfus Clin Biol.* 2006 Mar-Apr;13(1-2):103-110. doi: 10.1016/j.tracli.2006.03.001.
- 27) Li HY, Guo K. Blood Group Testing. *Front Med (Lausanne).* 2022 Feb 11;9:827619. doi: 10.3389/fmed.2022.827619.
- 28) Madireddy S, Rivas Chacon ED, Mangat R. Toxoplasmosis. [Updated 2022 Sep 26]. In: StatPearls [Internet]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563286/>.
- 29) Majeed KR, Al-Fahad D, Jalood HH et al. RhD blood type significantly influences susceptibility to contract COVID-19 among a study population in Iraq F1000Research 2021. doi: 10.12688/f1000research.27777.1.
- 30) Majumder J, Minko T. Recent Developments on Therapeutic and Diagnostic Approaches for COVID-19. *AAPS J.* 2021 Jan 5;23(1):14. doi: 10.1208/s12248-020-00532-2.
- 31) Merle NS, Boudhabhay I, Leon J, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement activation during intravascular hemolysis: Implication for sickle cell disease and hemolytic transfusion reactions. *Transfus Clin Biol.* 2019 May;26(2):116-124. doi: 10.1016/j.tracli.2019.02.008.
- 32) Mitra R, Mishra N, Rath GP. Blood groups systems. *Indian J Anaesth.* 2014 Sep;58(5):524-8. doi: 10.4103/0019-5049.144645.

- 33) Moulds, Joann M., and John J. Moulds. "Blood group associations with parasites, bacteria, and viruses." *Transfusion medicine reviews* 14.4 (2000): 302-311. doi: 10.1053/tmrv.2000.16227.
- 34) Mujahid A, Dickert FL. Blood Group Typing: From Classical Strategies to the Application of Synthetic Antibodies Generated by Molecular Imprinting. *Sensors (Basel)*. 2015 Dec 31;16(1):51. doi: 10.3390/s16010051.
- 35) Nardoza LM, Szulman A, Barreto JA, Araujo Junior E, Moron AF. Bases moleculares do sistema Rh e suas aplicações em obstetrícia e medicina transfusional [The molecular basis of RH system and its applications in obstetrics and transfusion medicine]. *Rev Assoc Med Bras* (1992). 2010 Nov-Dec;56(6):724-8. Portuguese. doi: 10.1590/s0104-42302010000600026.
- 36) Nayeri T, Moosazadeh M, Asl AD, Ghaffarifar F, Sarvi S, Daryani A. Toxoplasma infection and Rhesus blood group system: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2023 Jul 5;18(7):e0287992. doi: 10.1371/journal.pone.0287992.
- 37) Neamțu SD, Novac MB, Neamțu AV, Stanca ID, Boldeanu MV, Gluhovschi A, Stanca L, et al.. Fetal-maternal incompatibility in the Rh system. Rh isoimmunization associated with hereditary spherocytosis: case presentation and review of the literature. *Rom J Morphol Embryol*. 2022 Jan-Mar;63(1):229-235. doi: 10.47162/RJME.63.1.26.
- 38) Novotná M, Havlíček J, Smith AP, Kolbeková P, Skallová A, Klose J, Gasová Z, Písacká M, Sechovská M, Flegr J. Toxoplasma and reaction time: role of toxoplasmosis in the origin, preservation and geographical distribution of Rh blood group polymorphism. *Parasitology*. 2008 Sep;135(11):1253-61. doi: 10.1017/S003118200800485X.
- 39) Parker V, Tormey CA. The Direct Antiglobulin Test: Indications, Interpretation, and Pitfalls. *Arch Pathol Lab Med*. 2017 Feb;141(2):305-310. doi: 10.5858/arpa.2015-0444-RS.
- 40) Payne-James, Jason, and Roger Byard. *Encyclopedia of forensic and legal medicine*. Academic Press, 2015. ISBN: 9780128000557.
- 41) Pegoraro V, Urbinati D, Visser GHA, Di Renzo GC, Zipursky A, Stotler BA, Spitalnik SL. Hemolytic disease of the fetus and newborn due to Rh(D) incompatibility: A preventable disease that still produces significant morbidity and mortality in children. *PLoS One*. 2020 Jul 20;15(7):e0235807. doi: 10.1371/journal.pone.0235807.
- 42) Pérez-Álamos AR, Aguilar-Durán M, Estrada Martínez S, Ramos-Nevárez A, Guido-Arreola CA, Sifuentes-Álvarez A, Cerrillo-Soto SM, Ibarra RG, Alvarado-Esquivel C.

- Association between ABO and Rh blood groups and *Toxoplasma gondii* infection: A cross sectional study. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*. 2024 Jan 12. doi: 10.1556/1886.2023.00052.
- 43) PharmDr. Laca Megyesi Š. Životní cyklus *Toxoplasma gondii*. Online. In: MedicSpark, 2023. Dostupné z: <https://medicspark.cz/nemoci/toxoplazmoza-co-je-to-priznaky-a-sireni-jake-jsou-jeji-priznaky-a-jak-ovlivnuje-tehotenstvi/>. [cit. 2024-06-03].
- 44) Qureshi A, Salman M, Moiz B. Rhnull: a rare blood group phenotype. *J Pak Med Assoc*. 2010 Nov;60(11):960-1.
- 45) Ranjan S, Khan M, Kumar R, Das B, Singh N, Nayan N, et al. Frequency of Rh and Kell antigens among blood donors: A retrospective analysis from a tertiary care center in Eastern India. *J Hematol Allied Sci*. 2023;3:109-14. doi: 10.25259/JHAS_49_2023
- 46) Romanos-Sirakis EC, Desai D. ABO Blood Group System. 2023 Sep 9. In: StatPearls [Internet]. doi: 10.1016/j.amepre.2022.
- 47) Rong G, Zheng Y, Chen Y, Zhang Y, Zhu P, Sawan M. COVID-19 Diagnostic Methods and Detection Techniques. *Encyclopedia of Sensors and Biosensors*. 2023:17–32. doi: 10.1016/B978-0-12-822548-6.00080-7.
- 48) Rosenkrans D, Zubair M, Doyal A. Rh Blood Group System. 2023 Aug 2. In: StatPearls [Internet]. doi:10.1201/9781315152539.
- 49) Rout P, Harewood J, Ramsey A, Master SR. Hemolytic Transfusion Reaction. 2023 Sep 12. In: StatPearls [Internet]. doi: 10.1016/j.huro.2017.05.090.
- 50) Sarwar A, Citla Sridhar D. Rh Hemolytic Disease. 2023 Mar 6. In: StatPearls [Internet]. doi:10.17226/249652.
- 51) Scordio T. Krevní nátěr u syndromu Rh deficiencie. Online. In: ASH Image bank, 2016. Dostupné z: <http://imagebank.hematology.org/image/60308/spherocytes--hereditary-spherocytosis>. [cit. 2024-06-03].
- 52) Shuhong Yu, Jie Xiao, Hong Xu, Yushiang Lin, Jhysheng Chang, Yanbin Li, Dezhen Gao, Shuai Pang, Zhiyuan Xu, Tianhong Miao. The best strategy of blood transfusion in patients with Rhnull syndrome[J]. *Blood&Genomics*, 2017, 1(2): 71-74. doi: 10.46701/APJBG.20170217026.
- 53) Scheckel CJ, Go RS. Autoimmune Hemolytic Anemia: Diagnosis and Differential Diagnosis. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2022 Apr;36(2):315-324. doi: 10.1016/j.hoc.2021.12.001.

- 54) Slovakova M, Bilkova Z, Korecka L. Princip primeho Coombsova testu. In: Vybrana laboratornı cvıenı z imunoanalytickych metod, 2013. ISBN: 978-80-7395-610-3 [cit. 2024-06-03].
- 55) Sun Y, Zhang J. Helicobacter pylori recrudescence and its influencing factors. J Cell Mol Med. 2019 Dec;23(12):7919-7925. doi: 10.1111/jcmm.14682.
- 56) Taha SAH, Osman MEM, Abdoelkarim EAA, Holie MAI, Elbasheir MM, Abuzeid NMK, Al-Thobaiti SA, Fadul SB, Konozy EHE. Individuals with a Rh-positive but not Rh-negative blood group are more vulnerable to SARS-CoV-2 infection: demographics and trend study on COVID-19 cases in Sudan. New Microbes New Infect. 2020 Nov;38:100763. doi: 10.1016/j.nmni.2020.100763.
- 57) Van Kim CL, Colin Y, Cartron JP. Rh proteins: key structural and functional components of the red cell membrane. Blood Rev. 2006 Mar;20(2):93-110. doi: 10.1016/j.blre.2005.04.002.
- 58) W. John Spicer. Microbiologıa clınica y enfermedades infecciosas. 2o Edicion. Melbourne (Australia). Elsevier. 2009. ISBN: 978-84-8086-425-1.
- 59) Wang B, Jin S, Yan Q, Xu H, Luo C, Wei L, Zhao W, Hou X, Ma W, Xu Z, Zheng Z, Sun W, Lan L, Zhang W, Mu X, Shi C, Wang Z, Lee J, Jin Z, Lin M, Jin H, Zhang L, Guo J, Zhao B, Ren Z, Wang S, Xu W, Wang X, Wang J, You Z, Dong J. AI-assisted CT imaging analysis for COVID-19 screening: Building and deploying a medical AI system. Appl Soft Comput. 2021 Jan;98:106897. doi: 10.1016/j.asoc.2020.106897.
- 60) Yang JC, Lu CW, Lin CJ. Treatment of Helicobacter pylori infection: current status and future concepts. World J Gastroenterol. 2014 May 14;20(18):5283-93. doi: 10.3748/wjg.v20.i18.5283.
- 61) Zietz M, Zucker J, Tatonetti NP. Associations between blood type and COVID-19 infection, intubation, and death. Nat Commun. 2020 Nov 13;11(1):5761. doi: 10.1038/s41467-020-19623-x.
- 62) Zoubi MA, Zulfıqar B, Kulkarni M. Cerebral toxoplasmosis requiring urgent brain biopsy. IDCases. 2017 May 11;9:59-61. doi: 10.1016/j.idcr.2017.05.003.