

Transfer-Faktor-Behandlung der chronischen mukokutanen Candidiasis

Von

L. KARMAZSIN, Éva OLÁH und GY. SZEGEDI

Kinderklinik und III. Medizinische Klinik der Medizinischen Universität

Debrecen, Ungarn

(Eingegangen am 15. Dezember 1975)

Bei chronischer mukokutaner Candidiasis konnte durch Verabfolgung des aus dem Blut eine intensive Candida-positive Hautreaktion zeigenden Eltern verfertigten Transfer-Faktors sowohl klinisch als auch immunologisch eine ausdrückliche Remission erreicht werden. Vorbedingungen der Behandlung sind die intensive Sensitivität der Donoren, die entsprechende Dosierung des Transfer-Faktors und die aktive Mitwirkung des Empfänger-Organismus.

Die von LAWRENCE und Mitarb. [10] unter der Bezeichnung Transfer-Faktor beschriebene Substanz bot eine gewisse Möglichkeit zur vorübergehenden Korrektur der auf zellulärer Immundefizienz beruhenden Krankheitsbilder.

Der Transfer-Faktor ist eine aus sensibilisierten Lymphozyten und Inkubation mit Antigen freiwerdende, kleinemolekuläre, dialysierbare Substanz, mit der die Überempfindlichkeit verzögerten Typs vom sensibilisierten Individuum spezifisch auf das nicht sensibilisierte Individuum übertragen werden kann [11]. Der Transfer-Faktor ist kein Immunglobulin und verfügt über keine immunogene Wirkung; chemisch besteht er aus Polypeptiden und Oligonukleotiden; das Molekulargewicht beträgt etwa 10 000. Die in vivo Wirkung des Transfer-Faktors, welcher seine Aktivität in lyophilisiertem Zustand bei

—20 °C jahrelang beibehält, manifestiert sich in einer positiven Hautreaktion, die 2-3 Stunden nach der Verabreichung erscheint und längere Zeit anhält. In vitro werden die nicht sensibilisierten Lymphozyten durch den Transfer-Faktor in der Anwesenheit von Antigen zur Blasttransformation und Vermehrung angeregt und ihre bis dahin niedrige DNA-Synthese wesentlich gesteigert. Dieser Effekt kommt in den T-Lymphozyten zur Geltung, indem die auf zellulärer Funktion beruhende Bakterien-, Virus-, Pilz-, Histokompatibilität und Tumormunität durch den Faktor selektiv vermittelt werden [11, 12]. In bezug auf den Wirkungsmechanismus wird angenommen, daß es sich in oder auf diesen Zellen, spezielle Rezeptorstellen befinden, die mit dem Transfer-Faktor in Verbindung treten. Ob der Transfer-Faktor das Rezeptormolekül der T-Zelle ist, oder ob durch

den Faktor die antigenspezifische Rezeptorsynthese der »unverpflichteten« Lymphozyten induziert wird [2], ist noch ungeklärt. Trotz der unentschiedenen theoretischen Fragen bedeutet die Tatsache, daß mit Hilfe dieser Substanz die Sensitivität empfindlicher Individuen übertragen werden kann, eine wertvolle, häufig lebensrettende therapeutische Möglichkeit bei auf zellulärer Immundefizienz beruhenden Krankheitsbildern, wie z.B. das ALDRICH—WISKOTTSCHE Syndrom und die chronische mukokutane Candidiasis, bei denen selbst die wirksamsten Antibiotika bzw. Antimykotika erfolglos sind. Bei diesen Prozessen kommt als Kausaltherapie ausschließlich eine — wenn auch vorübergehende — Korrektur des immunologischen Zustandes in Frage. Gegenwärtig stehen hierzu zwei Möglichkeiten zur Verfügung: 1. die Transfusion von immunkompetenten Lymphozyten bzw. die Transplantation gewisser Organe (Knochenmark, Thymus); der Anwendung dieser Verfahren stehen aber

gewisse Hindernisse (Ausstoßung, Graft-versus-Host-Reaktion, HLA-Identifizierung) im Wege. 2. Zufuhr des dialysierbaren Transfer-Faktors in den erkrankten Organismus.

Die über die vorteilhafte Anwendung des Transfer-Faktors berichtenden Literaturdaten [3, 4, 5, 8, 9, 13, 14, 18] und der mit Antimykotika bzw. Antibiotika unbeeinflussbare Zustand eines Patienten veranlaßten uns, den therapeutischen Effekt des Transfer-Faktors zu erproben.

FALLDARSTELLUNG

T. Cs., ein 2jähriges Kind wurde auf unsere Abteilung das erstmal im Alter von 8 Monaten, wegen seit der Geburt bestehender, generalisierter Candidamykose aufgenommen. Die Veränderung meldete sich zuerst auf der Schleimhaut (Abb. 1) um sich — trotz der ständigen lokalen Behandlung — allmählich auf die behaarte Kopfhaut, den Rücken, die Schultern, den Unterbauch und auf die Genitalien zu verbreiten (Abb. 2). Im 6monatigen Alter trat eine schwere, mit Antibiotika und Antimykotika unbeeinflussbare zwei-



ABB. 1. Mykose im Mundwinkel und auf der bukkalen Schleimhaut



ABB. 2. Mykotische Hautveränderung im Bereich des Unterbauchs und der Genitalien

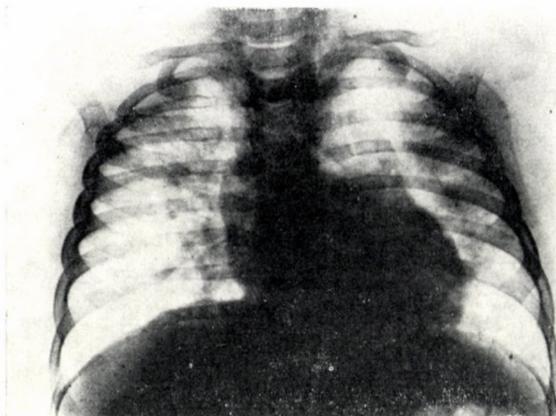


ABB. 3. Röntgenbild der Bronchopneumonie mit annehmbar mykotischer Ätiologie

seitige Bronchopneumonie auf (Abb. 3). Die Antimykotika-Resistenz der Krankheit und die Mitbeteiligung der Lunge im Prozeß lenkten unsere Aufmerksamkeit in Richtung der Schädigung des Immunsystems. Im Interesse der Beurteilung der Immunreaktivität haben wir die nächstfolgenden Untersuchungen durchgeführt: 1. intrakutane Hautprobe mit Candida-Antigen und gereinigtem Tuberkulin; 2. Bestimmung der Anti-Candida-Antikörper; 3. Lymphoblasttransformation; 4. Leukozyten-Migrationstest; 5. Bestimmung der Zahl der T-Lymphozyten im peripheren Blut mit Hilfe der Rosettenbildung; 6. Lymphknotenbiopsie.

METHODEN

ad 1. Zur intrakutanen Hautprobe kamen Candida-Antigen (BENCARDSches Candida-Antigen) und gereinigtes Tuberkulin (lyophilisiertes, gereinigtes Tuberkulin, HUMAN, Budapest) zur Anwendung.

ad 2. Im Serum wurden Anti-Candida-Antikörper (Präzipitin, Agglutinin) bestimmt [16]. Als Antigen dienten abgetötete *Candida-albicans*-Zellen und mit JELINOWScher β -Naphthol-Hydrolyse gewonnenes Polysacchariden-N-Komplex-Antigen [6]. Die Bestimmung des Agglutinititers erfolgte durch Serumverdünnung,

die des Präzipitintiters durch Antigenverdünnung.

ad 3. Lymphoblast-Transformation: Ein aus 2 ml 3,3%iger Na-Zitrat-Lösung, 1 ml Dextran (10%iges Rheomacrodex) und 8 ml Blut bestehendes Gemisch wurde anderthalb Stunden lang sedimentiert, und das Supernatant mit der fünffachen Menge serumfreier Parker 199 vermischt. Der Lymphozytengehalt der auf diese Weise gewonnenen Zellsuspension schwankte zwischen $0,1$ und $1,5 \times 10^6$ ml. Die Züchtung erfolgte in Fraktionen zu 3 ml. Als aspezifischer Stimulator wurde Phytohämagglutinin (DIFCO-PHA-P) in einer Verdünnung 1:300 angewandt. Als spezifisches Antigen dienten eine gereinigte Tuberkulinlösung (0,25 TE und 2,5 TE cc) sowie aus *Candida albicans* mit der JELINOWSchen Methode hergestelltes Antigen (Verdünnung 1:10 und 1:100). Die Züchtungsdauer betrug im Falle von PHA 72 Stunden und bei Anwendung des spezifischen Antigens 120 Stunden. 24 Stunden vor Beendigung der Züchtung wurde jede Kultur mit 3 mCi ^3H -Thymidin (Radiochemical Centre, Amersham, Thymidine- $6\text{-}^3\text{H}$; spezifische Aktivität: 29 Ci/mMol-120 mCi/mg) versetzt. Hiernach wurden die Kulturen mit physiologischer Kochsalzlösung und danach mit 5%iger, kalter Trichloressigsäurelösung gewaschen. Die Gesamtmenge des in Soluen gelösten Präzipitats wurde in 10 ml toluolhaltige Szintillatortflüssigkeit übertragen. Die Messungen erfolgten mit dem Packard-Tricarb-Apparat. Die Ergebnisse sind in dpm angegeben. Als positiv betrachteten wir bei Stimulationen mit spezifischem Antigen einen Indexwert über 2 und bei Stimulationen mit PHA einen Indexwert über 10.

ad 4. Der Leukozyten-Migrationstest wurde mit der von SZABÓ und Mitarb. [17] modifizierten Technik durchgeführt. Die Migrationskammer wurden mit serumfreien Parker 199 bzw. einem aus Nährflüssigkeit und Antigen bestehenden Gemisch aufgefüllt. Die folgenden Antigene wurden angewendet: a) gereinigtes lyophilisiertes

Tuberkulin (HUMAN, Budapest), in Konzentrationen von 0,25 TE/ml und 2,5 TE/ml; b) von *Candida albicans* mit der JELINOWSchen Methode hergestelltes Antigen, in Verdünnungen von 1/10 und 1/100. Der Migrationsindex wurde aus der Gewichtsproportion der nach 20stündiger Inkubation bei 37 °C projizierten Migrationsgebiete ausgerechnet.

$$MI_{MI} = \frac{\text{Durchschnittsgewicht der mit Antigen gehemmten Gebiete}}{\text{Durchschnittsgewicht der Kontrollgebiete}}$$

Als Migrationshemmung wurden Werte unter 0,8 und als Migrationsförderung Werte über 1,2 betrachtet.

ad 5. Die mit Schaferthozyten rosettenbildenden Lymphozyten wurden mit der sog. aktiven Methode von WYBRAIN und FUDENBERG [19, 20] sowie nach JONDAL und Mitarb. [7] untersucht, d. h. es wurde die Proportion der aktiven rosettenbildenden sowie der total-rosettenbildenden Lymphozyten bestimmt. Die Menge der T-Lymphozyten wurde auf mm^3 Blut bezogen ausgerechnet.

Verfertigung des Transfer-Faktors: Das mit Heparin entnommene Blut wurde 1:2 mit Gelifundol (Biotest-Serum-Institut GmbH, Frankfurt a.M.) versetzt und bei Zimmertemperatur 2 Stunden lang sedimentiert sodann mit 2000 g 10 Minuten lang zentrifugiert. Zur Zellzählung wurde das Sediment in eine entsprechende PBS-Menge aufgenommen. Zerstörung der Zellen: Ein dünnwandiges, die Zellsuspension enthaltendes Kunststoffgefäß wird in flüssige Luft getaucht und nachdem die Suspension vollkommen gefroren ist, in ein Wasserbad mit einer Temperatur von 40 °C gelegt. Dieser Prozeß wird mindestens fünfmal wiederholt. Nun legt man die Zellsuspension in eine Dialysiermembran und dialysiert gegen destilliertes Wasser bei 4 °C, 48 Stunden lang. Das Dialysat wird lyophilisiert, danach wieder gelöst und steril filtriert. Eine Dosis Transfer-Faktor wurde aus $4\text{-}5 \times 10^8$ Zellen verfertigt. Den bei unseren Patienten verwendeten Transfer-Faktor haben wir aus

dem Blut der intensiv Candida-positiven Eltern hergestellt.

Anwendungsweise: Eine Dosis Transfer-Faktor wurde im allgemeinen in 5 ml steriler Kochsalzlösung gelöst und i. m. injiziert. Als Nebenwirkungen meldeten sich lokale Schmerzen, Hautröte und knapp einen Tag lang anhaltendes Fieber.

ERGEBNISSE

Die vor und nach der Transfer-Faktor Behandlung ermittelten Ergebnisse unserer immunologischen Untersuchungen veranschaulicht Tabelle I. Gegenüber dem spezifischen Antigen (Candida) und PPD war eine

TABELLE I
Ergebnisse vor und nach Transfer-Faktor-Behandlung

	Intrakutanprobe		Anti-Candida Antikörper		Lymphozyten stimulierender Faktor			Migrationshemmender Faktor		Ro—Ly		Thymus-Lymphozyten per ml
	Candida	PPD	P	A	PHA	C	PPD	PPD	C	Wo	Ro	
Vor Transfer-Faktor-Behandlung	—	—			+	+	+	+	+		14	342
Nach Transfer-Faktor-Behandlung												
I. 23.5.1974	—	+			+	+	+	+	+			
II. 4.6.1974	—	+			+	+	+	+	+	30	48	2154
III. 26.7.1974	—	+			+	+	+	+	+		48	1774
IV. 12.9.1974	±	++	128	10 000	+	+	+	+	+		58	1904

PPD = Tuberkulin

P = Präzipitation

A = Agglutination

PHA = Phytohämagglutinin

Ro = Rosettenbildende Lymphozyten (total)

Überempfindlichkeits-Hautreaktion negativen Spättyps zu beobachten; diese Hautanergie gilt als ein allgemeines Charakteristikum der Krankheit. Die Stimulierbarkeit durch Phytohämagglutinin war verringert, dagegen ließ sich in der Anwesenheit von Antigen eine ausreichende Produktion des migrationshemmenden Faktors feststellen. Die Zahl der T-Lymphozyten war sowohl im peripheren Blut, als auch in den entfernten Lymphknoten erniedrigt. Die aus der peripheren Lymphozytenkultur durchgeführten Chromosomen-

untersuchungen ergaben ein normales Ergebnis.

Das Kind erhält seit Mai 1972 vom klinischen Zustand abhängig, intermittierend Transfer-Faktor-Injektionen, worauf sich stets Remission und immunologische Besserung melden. Die ausgedehnten Hautsymptome gingen stufenweise vollkommen zurück (Abb. 4), die Bronchopneumonie heilte; die Mundschleimhaut, die zwar niemals symptomfrei wurde, konnte nach der Transfer-Faktor-Behandlung durch lokale antimykotische Therapie beeinflußt werden.

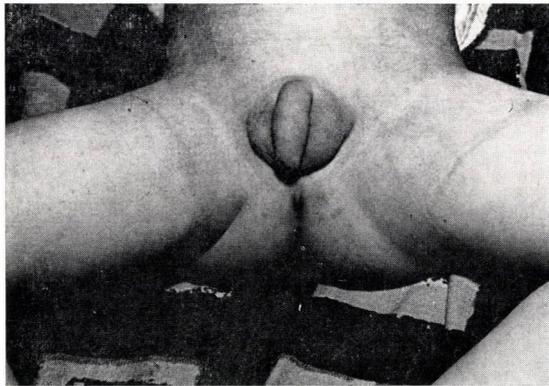


ABB. 4. Nach Transfer-Faktor-Behandlung; keine mykotischen Hautveränderungen

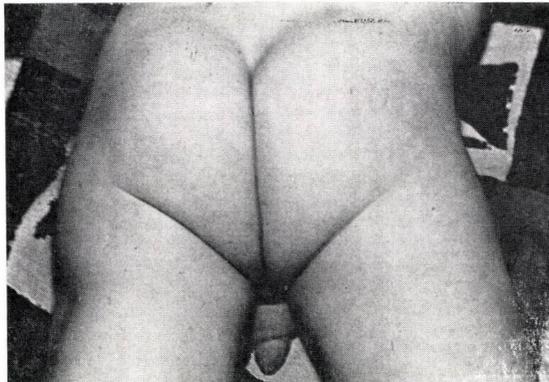


ABB. 5. Nach Transfer-Faktor-Behandlung; keine mykotischen Hautveränderungen

Die wichtigste Änderung war vielleicht das Positivwerden der Hautproben; gegenüber Tuberkulin ließ sich die positive Hautreaktion am zweiten und gegenüber Candida am vierten Tag verzeichnen. Die Zahl der rosettenbildenden T-Lymphozyten erhöhte sich, PHA-Stimulierbarkeit und MIF-Bildung der Lymphozyten blieben dagegen nahezu unverändert.

Auf die klinische Remission folgten immer wieder Relapse, die durch Verschlechterung der Mundschleimhautsymptome, Erscheinen der Hautläsionen, Fieber und Lungeninfektion charakterisiert waren. Beim Aufflackern der Krankheit wurde die Transfer-Faktor-Therapie — und zwar in Kombination mit Amphotericin B, Nystatin und lokaler Clotrimazol-Behandlung — stets wiederholt.

Gegenwärtig befindet sich das Kind in klinischer Remission: Fieber und Hautsymptome sind verschwunden, auf der Mundschleimhaut melden sich zeitweise, durch lokale Behandlung gut beeinflussbare Symptome; die statische und mentale Entwicklung des Kindes sind augenfällig.

BESPRECHUNG

Bei chronischer mukokutaner Candidiasis vermochten wir mit der als Ergänzung der antimykotischen Therapie angewandten Transfer-Faktor-Behandlung ein befriedigendes — und bei einer Gelegenheit im dargestellten Fall sogar ein lebensrettendes — Ergebnis zu erreichen. Unsere Erfahrungen stimmen mit den Literaturangaben in einiger Hinsicht nicht

überein. Die Ergebnisse der einzelnen Verfasser sind oft abweichend und manchmal sogar widerspruchsvoll. Die Erklärung dafür liegt darin, daß im Hintergrund der chronischen mukokutanen Candidiasis verschiedene immunologische Defekte stehen können, und der Erfolg der Behandlung die Funktion des Typs der Immunsystemschädigung ist. Eine Besserung kann nur in jenen Fällen erwartet werden, in denen durch die Schädigung des Immunsystems die Differenzierungsstelle der immunkompetenten Lymphozyten nicht tiefgreifend beeinträchtigt wird. Der Transfer-Faktor, der seine Wirkung auf den thymusdependenten Lymphozyten entfaltet, ist bei Thymusdysplasie bzw. bei auf Thymusdysgenese beruhenden Zuständen verständlicherweise wirkungslos. Laut einiger Verfasser ist für die Erfolglosigkeit der Transfer-Faktor-Therapie die fallweise nachweisbare Anwesenheit des die zelluläre Funktion der normalen Lymphozyten hemmenden Plasmainhibitors [15] verantwortlich. Nach unseren Erfahrungen lassen sich die Vorbedingungen der erfolgreichen Transfer-Faktor-Behandlung in folgendem zusammenfassen:

1. Nur von einer ausgesprochen positiven Kutanreaktion aufweisenden Donoren stammende Transfer-Faktor-Präparate eignen sich zum Übertragen der entsprechenden Sensitivität.

2. Zur wirksamen Behandlung sind entsprechend große Transfer-Faktor-Dosen erforderlich.

3. Die aktive Kooperation des Empfängerorganismus ist unerlässlich.

Die wichtigsten Vorteile der Behandlung sind, daß die bei der Transfusion der immunkompetenten Lymphozyten eine Gefahr bedeutende Graft-versus-Host-Reaktion nicht zu befürchten ist, daß das Präparat in lyophilisiertem Zustand 4-5 Jahre lang aufbewahrt werden kann und daß die therapeutische Wirkung durch gleichzeitig angewandte systematische antimykotische Behandlung wesentlich potenziert wird [4, 9, 13, 18]. Einen Nachteil bedeutet indessen, daß bei gewissen Schädigungen des Immunsystems der therapeutische Effekt ausbleibt. Die Nebenwirkungen — Fieber und lokale Reaktion — kontraindizieren die Anwendung des Transfer-Faktors nicht [2]. Die von BALLOW und Mitarb. [1] im Laufe der Transfer-Faktor-Behandlung beobachtete hämolytische Anämie meldete sich in unserem Fall nicht. Nach unseren Erfahrungen zeigen die Atemwegs- und Hautsymptome eine dramatische Besserung, während die Veränderungen der Mundschleimhaut eine geringere Regression zeigen. Was die immunologischen Parameter anbelangt, sind das Positiv-werden der negativen Hautproben und die Erhöhung der Zahl der T-Lymphozyten im peripheren Blut als die bedeutendsten zu betrachten.

Aufgrund der annähernd andert-halb-jährigen Behandlungszeit sind wir noch nicht in der Lage, endgültige Schlußfolgerungen zu ziehen. Unser Patient wird regelmäßig kontrolliert, insofern es sich für nötig erweist, werden wir die Behandlung fortsetzen.

Unser therapeutischer Versuch lieferte einerseits einen Beweis für den therapeutischen Wert des Transfer-Faktors, andererseits boten die ermittelten Erfahrungen eine Möglichkeit zur Klärung des immunologischen Hintergrunds der chronischen mukokutanen Candidiasis. Dosierung, optimale Häufigkeit der Anwendung sowie die Ergänzungstherapie sind Fragen, die noch gelöst werden müssen.

Anhand der neuesten Forschungen besteht eine Hoffnung, daß durch die klinische Anwendung des die Reife der Präkursorzellen beschleunigenden Thymosins und des die Leukozytenphagozytose fördernden Tuft-sins auch die mit dem Transfer-Faktor nicht ansprechbaren immunologischen Schädigungen beeinflußt werden können.

LITERATUR

1. BALLOW, M., DUPONT, B., GOOD, R. A.: Autoimmune hemolytic anemia in Wiskott-Aldrich syndrome during treatment with transfer factor. *J. Pediat.* **83**, 772 (1972)
2. BASTEN, A., CRAFT, S., KENNY, D. F., NELSON, D. S.: Uses of transfer factor. *Vox Sang.* (Basel) **28**, 257 (1975)
3. FEIGIN, R. D., SHACKELFORD, P. G., EISEN, S., SPITLER, L. E., PICKERING, L. K., ANDERSON, D. C.: Treatment of mucocutaneous candidiasis with transfer factor. *Pediatrics* **53**, 63 (1974)
4. FUDENBERG, H. H., SPITLER, L. E., LEVIN, A. S.: Treatment of immune deficiency. *Amer. J. Path.* **60**, 529 (1972)
5. HITZIG, W. H.: Der Transfer-Faktor und seine therapeutische Bedeutung. *Blut* **27**, 145 (1973)
6. JELINOW, N. P.: ЕЛИНОВ Н. П.: Новый диагностический препарат при кандидамикозах. *Мин. Здравоохран.* **24**—**27** СССР XII. (1956)

7. JONDAL, M., HALM, G., WIGZELL, H.: Surface markers on human T and B lymphocytes, I. A large population of lymphocytes forming nonimmune rosettes with sheep red blood cells. *J. exp. Med.* **136**, 207 (1972)
8. KIRKPATRICK, C. H., RICH, R. R., SMITH, T. K.: Effects of transfer factor on lymphocyte function in anergic patients. *J. clin. Invest.* **51**, 2948 (1972)
9. KIRKPATRICK, C. H., SMITH, T. K.: Chronic mucocutaneous candidiasis: Immunologic and antibiotic therapy. *Ann. intern. Med.* **80**, 310 (1974)
10. LAWRENCE, H. S.: The transfer of generalized cutaneous hypersensitivity of the delayed tuberculin type in man by means of the constituents of disrupted leukocytes. *J. clin. Invest.* **33**, 951 (1954)
11. LAWRENCE, H. S.: Transfer factor. *Advanc. Immunol.* **11**, 195 (1969)
12. LEVIN, A. S., SPITLER, L. E., FUDENBERG, H. H.: Transfer factor therapy in immune deficiency states. *Ann. Rev. Med.* **24**, 175 (1973)
13. PABST, H. F., SWANSON, R.: Successful treatment of candidiasis with transfer factor. *Brit. med. J.* **2**, 442 (1972)
14. PACHMAN, L. M., KIRKPATRICK, C. H., KAUFMAN, D. B., ROTHBERG, R. M.: The lack of effect of transfer factor in thymic dysplasia with immunoglobulin synthesis. *J. Pediat.* **84**, 681 (1974)
15. PATERSON, P. Y., SEMO, R., BLUMENSCHNEIN, G., WELSTADT, J. S.: Mucocutaneous candidiasis, anergy and a plasma inhibitor of the cellular immunity: Reversal after amphotericin B therapy. *Clin. exp. Immunol.* **9**, 595 (1971)
16. SEELIGER, H. P. R.: *Mykologische Serodiagnostik*. J. A. Barth Verlag, Leipzig 1958
17. SZABÓ, G., SZEGEDY, GY., GERGELY, J., FEKETE, B., PETRÁNYI, GY.: Autoimmun-betegek tuberculin érzékenységének vizsgálata leukocyta migratio gátlással immunosuppressív kezelés során. *Orv. Hetil.* **114**, 1914 (1973)
18. VALDIMARSSON, H., WOOD, C. B. S., HOBBS, J. R., HOLT, O.: Immunological features in a case of chronic granulomatous candidiasis and its treatment with transfer factor. *Clin. exp. Immunol.* **11**, 151 (1972)
19. WYBRAN, J., FUDENBERG, H. H.: Thymus derived rosette forming cells. *New Engl. J. Med.* **288**, 1072 (1973)
20. WYBRAN, J., LEVIN, A. S., SPITLER, L. E., FUDENBERG, H.: Rosette forming cells, immunologic deficiency diseases and transfer factor. *New Engl. J. Med.* **288**, 710 (1973)

Prof. Dr. L. KARMAZSIN

Gyermekklinika

H-4012 Debrecen, Ungarn