

Berufliche Allergien gegen Phytasen¹

Occupational Allergies to Phytase

Autoren

V. van Kampen, R. Merget, T. Brüning

Institut

BGFA – Forschungsinstitut für Arbeitsmedizin der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung, Institut der Ruhr-Universität Bochum (Direktor: T. Brüning)

eingereicht 23.9.2008

akzeptiert 25.9.2008

Bibliografie

DOI 10.1055/s-2008-1038287

Online-Publikation: 14.11.2008

Pneumologie 2008; 62: 707–710

© Georg Thieme Verlag KG

Stuttgart · New York

ISSN 0934-8387

Korrespondenzadresse

Dr. rer. nat. Vera van Kampen

BGFA

Bürkle-de-la-Camp-Platz 1

44789 Bochum

kampen@bgfa.de

Serienherausgeber

R. Merget, Bochum

D. Nowak, München

Zusammenfassung



Phytasen sind Phosphatasen, die Phytinsäure hydrolytisch abbauen. Sie machen dadurch den in Pflanzen vorhandenen Phosphor für Tierorganismen verfügbar und werden deshalb in steigendem Maße kommerziellem Tierfutter – insbesondere bei der Schweine- und Geflügelmast – zugesetzt. Bereits seit längerem ist bekannt, dass die berufliche Exposition gegenüber Enzymstäuben zu einer Soforttypallergie führen kann. Die vorliegende Arbeit gibt einen Überblick über die Ergebnisse einer Literaturschau hinsichtlich der berufsbedingten atemwegssensibilisierenden Wirkung von Phytasen. Durch die dargestellten Studien sind Fälle von spezifischer Überempfindlichkeit der Atemwege oder der Lunge durch Phytasen gut belegt. Da Symptome, Hauttestergebnisse, der Nachweis spezifischer IgE-Antikörper und die Ergebnisse spezifischer Provokationstests in der Regel gut übereinstimmen, ist ein immunologischer Wirkmechanismus gesichert.

Abstract



Phytases are phosphatases that can break down the undigestible phytic acid (phytate). They are frequently used as an animal feed supplement – often in poultry and swine – to enhance the nutritive value of plant material by liberation of inorganic phosphate from phytate. Exposure to enzyme dusts has long been known to cause occupational allergies. The present paper reviews the results of the evaluation of literature data concerning occupational airway sensitization due to phytases. Cases of specific airway sensitization caused by phytases could be shown clearly by the presented studies. As symptoms, results of skin prick tests, detection of specific IgE-antibodies and results of specific challenge tests are consistent, an immunologic mechanism can be assumed.

Einleitung



Phytasen sind Phosphatasen, die die Hydrolyse von Phytinsäure (Phytat) unter Freisetzung anorganischen Phosphats katalysieren. Sie sind weit verbreitet und finden sich natürlicherweise in Pflanzen, in tierischem Gewebe und in Mikroorganismen. Pflanzliche Phytasen kommen hauptsächlich in keimenden Samenkörnern vor und führen dort zur Freisetzung des gebundenen Phosphats. Industriell kommen vor allem 3-Phytasen (EC 3.1.3.8) und 6-Phytasen (Synonym 4-Phytasen, EC 3.1.3.26) zum Einsatz. 3-Phytasen spalten zunächst die Phosphatgruppe am C3-Atom des Inositrings ab, während 6-Phytasen mit dem Angriff auf die Phosphatgruppe am C6-Atom beginnen. Je nach Ursprungsorganismus unterscheiden sich die Molmassen der ver-

schiedenen Phytasen. Sie betragen zwischen 38 kDa und 490 kDa. Die meisten Phytasen weisen ein pH-Optimum zwischen 4,5 und 6,0 auf. Nur wenige besitzen ein pH-Optimum im neutralen bis basischen Bereich (pH 7–8). Das Temperatur-Optimum der Phytasen liegt zwischen 50 °C und 60 °C.

In pflanzlichen Futtermitteln liegen ca. 50–80% des Phosphors als Phytat gebunden vor. Nur durch das Enzym Phytase kann dieser Phosphor nutzbar gemacht werden. Anders als wiederkäu-

¹ Diese Arbeit ist eine modifizierte Version einer Publikation der Senatskommission der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe (erschieden in der 45. Ergänzungslieferung der Toxikologisch-arbeitsmedizinischen Begründungen von MAK-Werten, Wiley VCH, 2008).

Tab. 1 Klinische Untersuchungen zur atemwegssensibilisierenden Wirkung von Phytasen beim Menschen

Zahl der Untersuchten	Arbeitsplatzbezogene Symptome bzw. klinische Diagnosen	Pricktest (Testkonzentration)	Nachweismethode spezifische IgE-Antikörper (RAST-Klasse)	Bronchiale Provokation (Testkonzentration)	Literatur
1	100% Husten, pfeifende Atmung	positiv (5 mg/ml)	RAST positiv	positiv (3 min mit Pulver) FEV ₁ -Abfall 28 %	[7]
11	6/11 (Husten, Kurzatmigkeit, Engegefühl Brust)	n. d.	EIA (Ausgangsmaterial Enzymlösung) positiv: Exponierte: 9/11 Kontrollen: 6/30	n. d.	[8]
49	bei Hochexponierten (n = 8): 8 × Rhinitis, 7 × Konjunktivitis 5 × Bronchitis	11/17 positiv	EAST positiv: Hochexponierte: 5/8 Niedrigexponierte: 5/23 2 × Klasse 1, 3 × Klasse 2, 5 × Klasse 3)	11/13 nasal	[9, 10]
53	38/53 12 × Atemnot; 35 × Rhinitis, 16 × Konjunktivitis 3 × Haut	16/19 Symptomatischen positiv	EAST positiv: 14/38 Symptomatischen 1/15 Asymptomatischen	14/15 nasal	[11, 12]
48 Fabrik A 38 Fabrik B	k. A.	4/48 (10 % w/v in PBS) 3/38 (1 : 20 in 50 % Glycerin, 0,9 % NaCl)	n. d.	n. d.	[13]
140	22 × Rhinitis 6 × Atemwegsbeschwerden	5/140 positiv (100 µg/ml)	n. d.	n. d.	[14]

ende Nutztiere bilden Schweine und Geflügel (Monogastrier) keine Phytasen und sind somit nicht in der Lage, den in der pflanzlichen Nahrung enthaltenen Phytat-gebundenen Phosphor zu erschließen. Seit Anfang der 90er-Jahre wird deshalb dem Futter dieser Tiere häufig das Enzym Phytase zugesetzt, so dass der in den Futterpflanzen vorhandene Phosphor als Nährstoff besser erschlossen werden kann. Somit kann auf die sonst übliche Zufütterung von Phosphat verzichtet werden, was zur Folge hat, dass der Phosphorgehalt in Gülle oder Stalldung sinkt und die Phosphatbelastung der Umwelt bei der Düngung deutlich reduziert werden kann. Die als Futtermittelzusatzstoff verwendeten Phytasen werden in der Regel mit gentechnisch veränderten Mikroorganismen als Produktionsorganismen (*Aspergillus*-Arten, *Trichoderma*-Arten) hergestellt.

Literaturauswertung

Mithilfe geeigneter Stichwörter in sinnvoller Kombination wurden Veröffentlichungen in der Datenbank „PubMed“ recherchiert. Uns im Original zugängliche relevante Publikationen über Studien zur sensibilisierenden Wirkung von Phytasen wurden hinsichtlich der klinischen Daten ausgewertet. Erfasst wurden neben der Zahl der exponierten Personen die Prävalenzen der einzelnen Symptome bzw. Diagnosen. Darüber hinaus wurde festgehalten, mit welchen Methoden (Hauttest, Bestimmung spezifischer IgE-Antikörper, Provokationstest) und unter Verwendung welcher Testlösungen eine auf Phytasen zurückzuführende Sensibilisierung diagnostiziert wurde.

Ergebnisse

Die Auswertung der Literatur zeigt, dass Phytasen ebenso wie auch anderen Enzymen (Subtilisin [1], Cellulase [2] und Xylanase [3], Papain [4], Bromelain [5], Übersicht bei [6]), eine atemwegssensibilisierende Wirkung zukommt.

Atemwegssensibilisierende Wirkung

Einen zusammenfassenden Überblick über die Ergebnisse der Literaturschau sowie präzise Angaben zu den durchgeführten Tests gibt **Tab. 1**.

Eine Kasuistik beschreibt den Fall eines 43-jährigen Beschäftigten einer Tierfutterfabrik, bei dem 7 Jahre zuvor Asthma diagnostiziert wurde. Zurzeit der Untersuchung klagte der Patient über seit 8 Wochen andauernde arbeitsplatzbezogene Beschwerden. Das Enzym Phytase wurde in dem Betrieb erst seit einem Jahr, β -Glucanase bereits seit 9 Jahren eingesetzt. Der Pricktest mit Phytase führte zu einer Quaddel von 5 mm. Der Pricktest mit β -Glucanase verlief ebenfalls positiv (Quaddelgröße 7 mm). Mittels Radio Allergo Sorbent-Test (RAST), bei dem Bindungswerte $\geq 2\%$ als positiv galten, konnten im Serum des Patienten erhöhte Werte für spezifische IgE-Antikörper gegen Phytase und β -Glucanase nachgewiesen werden (2,5 % bzw. 9,3 % Bindung). Dies war nicht der Fall bei der Verwendung von Nabelschnurblut als Negativkontrolle. Die Sensibilisierung gegen Phytase und β -Glucanase wurde im Expositionstest bestätigt. Nachdem der Patient jeweils reines Enzympulver von seinem Arbeitsplatz 3 Minuten mittels zweier Gefäße hin- und hergeschüttet hatte, kam es zu einem deutlichen Abfall des forcierten expiratorischen Volumens in der ersten Sekunde (FEV₁) [7].

Nachdem in einem Betrieb zur Futtermittelherstellung ein Fall einer berufsbedingten Atemwegserkrankung aufgetreten war, wurden 11 gegenüber Phytase exponierte Arbeiter bezüglich arbeitsplatzbezogener Beschwerden befragt und ihre Seren auf das Vorhandensein Phytase-spezifischer IgE-Antikörper untersucht. 6 der 11 exponierten Arbeiter gaben arbeitsplatzbezogene Beschwerden an. Die Exposition der Arbeiter erfolgte durch das Streuen einer pulverförmigen bzw. durch Versprühen einer flüssigen Phytasemischung, wobei die Phytase jeweils aus *Aspergillus niger* stammte. Eine durch Extraktion aus dem Pulver erhaltene Lösung enthielt 8 mg Protein/ml und 1 mg Kohlenhydrat/ml, die ursprünglich flüssige Zubereitung 28 mg Protein/ml und 4 mg Kohlenhydrat/ml. Zum Nachweis Phytase-spezifischer IgE-Antikörper mittels Enzyme Immunoassay (EIA) wurden Mikrotiterplatten mit diesen Extrakten beschichtet. Mit beiden Präparationen war die IgE-Bindung mit den Seren der 11 exponierten Arbeiter signifikant höher als mit Seren von 11 nicht-exponierten internen Kontrollen (Arbeiter der gleichen Fabrik) bzw. 19 nicht-exponierten externen Kontrollen. Die 4 exponierten Arbeiter mit den höchsten IgE-Konzentrationen zählten zu den 6 Personen, die über arbeitsplatzbezogene Symptome geklagt hatten. Durch Inhibitionsexperimente konnte gezeigt werden, dass die für die Tierfutterherstellung verwendete Phytasepräparation und verschiedene Schimmelpilze keine Kreuzreaktion aufweisen [8].

In einer Querschnittuntersuchung wurden 49 Personen untersucht, die bei analytischen Arbeiten mit Enzymstäuben und bei der Konfektionierung von reinem Phytasepulver exponiert waren. Berufsbedingte Beschwerden wurden in der Gruppe der 8 Hochexponierten häufiger angegeben als in der Gruppe der 41 Niedrigexponierten. Bei 31 von 32 Beschäftigten mit hinweisender Anamnese wurde ein Enzyme Allergo Sorbent-Test (EAST) durchgeführt. Phytase-spezifische IgE-Antikörper waren damit in der Gruppe der Hochexponierten bei 5 von 8, sowie bei 5 von 23 Geringexponierten nachweisbar. Bei 11 von 17 Personen verlief der Pricktest mit Phytase positiv. In allen dieser 11 Fälle konnte die Phytase-Sensibilisierung durch die nasale Provokation bestätigt werden, davon in 3 Fällen mit schwach positivem Ergebnis und in 2 Fällen ohne gleichzeitigen IgE-Nachweis. Insgesamt betrug die Sensibilisierungsquote gegen Phytase und eine ebenfalls getestete Xylanase im Gesamtkollektiv 27% [9,10].

In einer Querschnittstudie wurden 53 in der Herstellung und Verarbeitung von 3-Phytase aus *Aspergillus niger* beschäftigte Personen (14 Frauen, 39 Männer, mittleres Alter 38 ± 10) untersucht. Die Gruppe der Hochexponierten setzte sich aus 23 Personen, die der Niedrigexponierten aus 30 Personen zusammen. Insgesamt 38 der 53 untersuchten Beschäftigten gaben arbeitsplatzbezogene Beschwerden an. In der Gruppe der Hochexponierten wurden respiratorische (20 von 23 Beschäftigte) und konjunktivale Symptome (10 von 23 Beschäftigte) häufiger angegeben als in der Gruppe der Niedrigexponierten ($p=0,031$). Während mittels EAST bei den 38 symptomatischen Personen in 14 Fällen Phytase-spezifische IgE-Antikörper nachweisbar waren, war dies bei den 15 beschwerdefreien Personen lediglich einmal der Fall. Die Anzahl der IgE-Positiven war in der Gruppe der Hochexponierten höher als in der Gruppe der Niedrigexponierten (12 von 23 bzw. 3 von 30; $p=0,001$). Phytase-spezifische IgG-Antikörper fanden sich mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) bei 19 der 38 symptomatischen und bei 5 beschwerdefreien Personen. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der zuvor deglykosilierten Phytase war im Immunoblot bei Verwendung eines Poolserums, bestehend aus 5 IgE-positiven Seren, eine deutliche IgE-Bindung im Bereich von etwa 50 kDa

erkennbar. In diesem Molekulargewichtsbereich fand sich auch die Hauptproteinbande der deglykosilierten Phytase aus *Aspergillus niger*. Im Anschluss an die Untersuchungen wurden die Beschäftigten aufgefordert, Masken mit P 2-Filtern zu tragen. Bei einer erneuten Befragung nach 2–8 Wochen klagte keiner der Beschäftigten mehr über arbeitsplatzbezogene respiratorische Beschwerden [11].

Ergänzende Untersuchungen in dem oben beschriebenen Kollektiv ergaben, dass bei Pricktest-Untersuchungen mit Phytase 16 von 19 symptomatischen Beschäftigten positiv reagierten. Im nasalen Provokationstest zeigten 14 von 15 Patienten mit arbeitsplatzbezogenen Beschwerden einen positiven Befund. Die Autoren schlagen die Verwendung von Enzymen in nicht-staubender Form (z. B. als verkapselte Granulate) vor [12]. Es ist nicht transparent, inwieweit Überschneidungen mit dem in der älteren Studie [9,10] untersuchten Kollektiv vorlagen.

86 Beschäftigte aus 2 Tierfutterfabriken (48 aus Fabrik A, 38 aus Fabrik B) wurden zunächst im Pricktest mit jeweils 4 enzymhaltigen, zum Teil als Gemische vorliegenden Produkten aus ihrer Fabrik untersucht. Dabei reagierten insgesamt 8 der untersuchten Arbeiter mit einem der in den beiden Fabriken eingesetzten Enzympräparate. Mit einer Ausnahme reagierten alle 8 sensibilisierten Arbeiter auf mehr als ein Enzym(-gemisch), wobei sich diese gleichzeitigen Reaktionen auf Enzyme aus der jeweiligen Fabrik, die in der Regel aus demselben Ursprungsorganismus stammten, beschränkten. In Fabrik A wurde neben Endo-1,3(4)- β -Glucanase, α -Amylase, Endo-1,4- β -Xylanase und eine 3-Phytase aus *Trichoderma reesei* verwendet. Diese in pulverförmiger Form vorliegenden Enzyme wurden für die Pricktestung 24 Stunden mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (10% w/v) extrahiert. In Fabrik B wurde neben Endo-1,3(4)- β -Glucanase; Endo-1,4- β -Glucanase und Endo-1,4- β -Xylanase eine 6-Phytase in flüssiger Form eingesetzt. Dieses Enzym wurde in einem gentechnisch veränderten Stamm von *Aspergillus oryzae* produziert, das ursprüngliche Gen stammte jedoch aus dem Basidiomyceten (Ständerpilz) *Peniphora* sp.. Für den Hauttest wurde die flüssige Enzymlösung 1 : 20 mit Pufferlösung verdünnt.

Vier Arbeiter aus Fabrik A zeigten im Hauttest eine deutliche Reaktion auf die in ihrer Fabrik verwendete 3-Phytase aus *T. reesei*. Bei 3 von ihnen ergaben sich im Basophilen-Aktivierungstest positive Befunde (42%, 48%, 37% Aktivierung). Die prozentuale Basophilen-Aktivierung mit der Negativ- bzw. Positivkontrolle hatte 2,0% bzw. 55,5% betragen. Mit den Seren der 4 hauttestpositiven Arbeiter und zusätzlich dem Serum eines Arbeiters der Fabrik A, der jedoch nicht im Hauttest auf die 3-Phytase reagiert hatte, konnte eine Reaktion (einmal schwach positiv, zweimal positiv, zweimal deutlich positiv) im Immunoblot mit 3-Phytase erzielt werden.

3 der Arbeiter aus Fabrik B reagierten im Pricktest auf die dort verwendete 6-Phytase aus *Peniphora* sp.. In allen Fällen führten der Basophilen-Aktivierungstest (85% und zweimal 87% Aktivierung) und der Immunoblot (einmal positiv, zweimal deutlich positiv) zu positiven Befunden. Zwischen den Phytasen aus *T. reesei* und *Peniphora* sp. konnte im Immunoblot keine Kreuzreaktivität gezeigt werden [13].

In einer Querschnittstudie wurden 140 Beschäftigte aus 4 Tierfutterfabriken untersucht. In den Fabriken wurden seit 7–9 Jahren verschiedene pulverförmige oder granulierten Enzyme verwendet. Erst kurz vor Beginn der Studie im Jahr 1996 wurden erstmals flüssige Enzyme eingesetzt. Als Kontrollen dienten 78 nicht-exponierte Büroangestellte aus den Betrieben. Rhinitische Beschwerden wurden von den exponierten Personen doppelt so

häufig angegeben wie von den Kontrollen (16% vs. 8%), während in beiden Gruppen gleich häufig über arbeitsplatzbezogene Beschwerden der unteren Atemwege geklagt wurde (4%). 5 der 140 exponierten (4%) und keine der nicht-exponierten Personen reagierten im Pricktest auf Phytase. Insgesamt auf Enzyme (Protease, α -Amylase, Cellulase, β -Glucanase, Xylanase oder Phytase) reagierten im Hauttest 10 der 140 (7%) exponierten Arbeiter. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen Enzymsensibilisierung und arbeitsbedingter Rhinitis (Odds ratio 4,8 [95% Konfidenzintervall 1,2 – 18,6]; adjustiert für Atopie) sowie zwischen Enzymsensibilisierung und Beschwerden an den unteren Atemwegen (OR 5,7 [95% KI 0,9 – 35,5]) war erkennbar [14].

Schlussfolgerung

Durch eine Anzahl von Studien sind Fälle von spezifischer Überempfindlichkeit der Atemwege durch die in der Regel aus Aspergillus-Arten stammenden Phytasen gut belegt, insbesondere wenn berücksichtigt wird, dass Phytasen in der Tierfutterindustrie erst seit Beginn der 90er-Jahre Verwendung finden. Da Symptome, Hauttestergebnisse, der Nachweis spezifischer IgE-Antikörper und die Ergebnisse spezifischer Provokationsteste in der Regel gut übereinstimmen, ist ein immunologischer Wirkmechanismus gesichert.

Literatur

- 1 Kampen V van, Merget R. Berufliche Atemwegssensibilisierungen durch Subtilisine. *Pneumologie* 2002; 56: 182 – 186
- 2 Kampen V van, Lessmann H, Brüning T et al. Berufliche Allergien gegen Cellulasen. *Pneumologie* 2003; 57: 388 – 391
- 3 Kampen V van, Merget R, Brüning T. Berufliche Allergien gegen Xylanasen. *Pneumologie* 2004; 58: 103 – 106
- 4 Kampen V van, Merget R, Brüning T. Berufliche Allergien gegen Papain. *Pneumologie* 2005; 59: 405 – 410
- 5 Kampen V van, Merget R, Brüning T. Berufliche Allergien gegen Bromelain. *Pneumologie* 2007; 61: 159 – 161
- 6 Baur X, Sander I, Kampen V van. Aerogene Enzyme sind aggressive berufliche Inhalationsallergene. *Dtsch Med Wochenschr* 2000; 125: 912 – 917
- 7 O'Connor TM, Bourke JF, Jones M et al. Report of occupational asthma due to phytase and beta-glucanase. *Occup Environ Med* 2001; 58: 417 – 419
- 8 Doekes G, Kamminga N, Helweggen L et al. Occupational IgE sensitisation to phytase, a phosphatase derived from *Aspergillus niger*. *Occup Environ Med* 1999; 56: 454 – 459
- 9 Straßburger K, Bossert J, Baur X et al. Sensibilisierung durch die Enzyme Phytase und Xylanase. In: Hallier E, Bünger J (Hrg). Dokumentationsband über die 38. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin. Lübeck, 1998: 525 – 527
- 10 Zober A, Straßburger K, Baur X. Response to a case of occupational asthma due to the enzymes phytase and beta-glucanase. *Occup Environ Med* 2002; 59: 64
- 11 Baur X, Melching-Kollmuss S, Koops F et al. IgE-mediated allergy to phytase – a new animal feed additive. *Allergy* 2002; 57: 943 – 945
- 12 Melching-Kollmuss S, Straßburger K, Bossert J et al. Allergische Reaktionen vom Typ I auf Phytase – ein neuer Futtermittelzusatz. *Atemw Lungenkrkh* 2001; 27: 351 – 352
- 13 Caballero ML, Gómez M, González-Muñoz M et al. Occupational sensitization to fungal enzymes used in animal feed industry. *Int Arch Allergy Immunol* 2007; 144: 231 – 239
- 14 Vanhanen M, Tuomi T, Tiikkainen U et al. Sensitisation to enzymes in the animal feed industry. *Occup Environ Med* 2001; 58: 119 – 123