

Berufliche Atemwegssensibilisierungen durch Subtilisine

V. van Kampen
R. Merget

Occupational Airway Sensitization Due to Subtilisin

Zusammenfassung

Seit den 60er Jahren wurden zunehmend berufsbedingte Allergien gegen natürliche, neuerdings auch gegen modifizierte, rekombinant hergestellte Enzyme beobachtet. Besonders häufig industriell eingesetzt und deshalb auch häufig Auslöser von Atemwegssensibilisierungen sind Subtilisine. Die hier vorgestellte Auswertung klinischer Daten aus der Literatur belegt das Sensibilisierungspotential dieser Enzymgruppe. Durch eine größere Zahl von Studien sind Fälle von spezifischer Überempfindlichkeit der Atemwege durch Subtilisine gut belegt. Da Symptome, Hauttestergebnisse, Nachweis spezifischer IgE-Antikörper und Ergebnisse spezifischer Provokationstests in der Regel gut übereinstimmen, ist ein immunologischer Wirkmechanismus gesichert.

Abstract

Since the 1960s an increasing number of occupational allergies against natural, and against modified recombinant enzymes were observed. Subtilisin, a frequently used enzyme often has been shown to cause airway sensitization. The present evaluation of clinical literature data confirms the sensitization potential of subtilisin. Several cases of specific airway hyperresponsiveness caused by subtilisin are verified by a number of studies. As symptoms, results of skin prick tests, detection of specific IgE-antibodies and results of specific bronchoprovocation tests are consistent, an immunologic mechanism is confirmed.

Einleitung

Serinproteasen bakteriellen Ursprungs (EC 3.4.21.62; früher EC 3.4.21.14) sind extrazelluläre Proteasen und werden nach dem bekanntesten Ursprungsorganismus *Bacillus subtilis* als Subtilisine bezeichnet [1]. Diese Enzyme spalten Eiweiße und dienen den Bakterien in erster Linie zur Nahrungsaufnahme. Die zwei wichtigsten Subtilisine (Alcalase® und Esperase®) werden aus *Bacillus subtilis* bzw. *B. licheniformis* gewonnen. Einen Überblick über die häufigsten industriell eingesetzten Subtilisine gibt Tab. 1. Proteasen, auch fungale, werden hauptsächlich in der Waschmittel- und Reinigungsmittelindustrie verwendet. Weitere Märkte sind

Stärkeherstellung, Nahrungsmittelverarbeitung, Futtermittel- und Silbergewinnung. Heutzutage werden Subtilisine häufig als Medikamente genutzt, die zur Entfernung von abgestorbenen Gewebeschichten und zur schnelleren Verheilung bei der Wundbehandlung eingesetzt werden. Das pH-Optimum der Alcalase® liegt im neutralen bis schwach alkalischen Bereich (pH 7–10), während die Esperase® unter stark alkalischen Bedingungen (bis pH 12) optimal arbeitet. Sie ist aber auch im schwächer alkalischen Milieu und bei niedrigen Temperaturen effektiv, was für die Waschmittelindustrie von besonderer Bedeutung ist [2].

Institutsangaben

Berufsgenossenschaftliches Forschungsinstitut für Arbeitsmedizin, BGFA, Bochum (Direktor T. Brüning)

Widmung

Diese Arbeit ist eine modifizierte Version einer Publikation der Senatskommission der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe (erschienen in der 33. Ergänzungslieferung der MAK-Werte, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen, Wiley VCH, 2001).

Korrespondenzadresse

Dr. rer. nat. V. van Kampen · BGFA · Bürkle-de-la-Camp-Platz 1 · 44789 Bochum · E-mail: kampen@bgfa.de

Bibliografie

Pneumologie 2002; 56: 182–186 © Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York · ISSN 0934-8387

Tab. 1 Kommerzielle Subtilisine, die in der Reinigungsmittelindustrie Anwendung finden (nach [2])

Handelsname	Ursprungsorganismus	pH-Optimum	Temperatur-Optimum (°C)	Hersteller
Alcalase	<i>B. licheniformis</i>	8–9	60	Novo Nordisk, Dänemark
Esperase	<i>B. subtilis</i>	9–11	60	Novo Nordisk, Dänemark
Savinase	<i>B. subtilis</i>	9–11	55	Novo Nordisk, Dänemark
Maxacal	<i>B. subtilis</i>	11	60	Gist-Brocades, Niederlande
Maxatase	<i>B. subtilis</i>	9,5–10	60	Gist-Brocades, Niederlande
Opticlean	<i>B. subtilis</i>	10–11	50–60	Solvay Enzymes, Deutschland
Optimase	<i>B. subtilis</i>	9–10	60–65	Solvay Enzymes, Deutschland
Protosol	<i>B. subtilis</i>	10	50	Advan. Biochem., Indien
Protease „Wuxi“	<i>B. subtilis</i>	10–11	40–50	Wuxi Synder, China
Proleather	<i>B. subtilis</i>	10–11	60	Amano Pharm., Japan
Durazym	veränderte Variante v. Savinase <i>B. subtilis</i>	10–10,5	50	Novo Nordisk, Dänemark
Maxapem	veränderte Variante aus <i>B. subtilis</i>	11–12	60	Solvay Enzymes, Deutschland
Purafect	rekombinant; Donor: <i>B. lentus</i> exprimiert in: <i>B. subtilis</i>	10	40–65	Genecor Int., USA

Die folgende Literatursauswertung gibt darüber Auskunft, welche Relevanz bakteriellen Serinproteasen (Subtilisinen) hinsichtlich beruflicher Atemwegsallergien zukommt.

Literatursauswertung

Mit Hilfe geeigneter Stichwörter in sinnvoller Kombination wurden die Abstracts infrage kommender Veröffentlichungen in einer Datenbank (MEDLINE), die etwa 9 Millionen medizinische Literaturzitate umfasst, gefunden. Die Abstracts wurden durchgesehen und bei Bestätigung, dass es sich um geeignete Literatur zum Thema handelt, die Originalarbeiten besorgt. Uns so zugängliche Publikationen aus der Zeit zwischen 1969 und 2000 über Studien zur atemwegssensibilisierenden Wirkung von Subtilisinen, wurden hinsichtlich klinischer 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 spez. IgE-Antikörper; Provokationstest) unter Verwendung welcher Testlösungen eine auf Subtilisine zurückzuführende Sensibilisierung diagnostiziert wurde. Einen zusammenfassenden Überblick über die Ergebnisse der Literatursauswertung gibt Tab 2.

Ergebnisse

Die atemwegssensibilisierende Wirkung von Subtilisin wurde bereits in den 60er Jahren beschrieben [3]. So berichtete Flindt 1969 [4] über 28 Beschäftigte in der Enzymindustrie, von denen 25 (89%) über berufsbedingte Atemwegsbeschwerden klagten. Im Haut-Pricktest mit entsprechenden Enzymlösungen (Maxatase, Alcalase; 1 mg/ml) zeigten 20 Probanden (71,4%) bereits nach 5 min. eine deutliche Reaktion.

Auch Pepys u. Mitarb. [5] beschrieben bereits 1969 die Kasuistiken von drei in der Enzymproduktion Tätigen, die über bronchiale Beschwerden nach dem Umgang mit *Bacillus subtilis*-Enzymen

klagten. In allen drei Fällen zeigten sich im Pricktest mit Alcalase- und Maxatase-Lösungen bei einer Konzentration von 10 mg/ml sehr starke Reaktionen (negativ bei nicht-exponierten Kontrollprobanden). Bei zwei der Exponierten wurde der Hauttest mit schwächer konzentrierten Lösungen (0,1 mg/ml bzw. 1 mg/ml) wiederholt und war ebenfalls positiv. Mit Hilfe von bronchialen Provokationstests (Alcalase-Lösungen 0,1–1 mg/ml) konnten die Enzymsensibilisierungen bestätigt werden. Bei zwei Probanden traten duale Reaktionen, bei einem eine Spätreaktion auf.

Juniper u. Mitarb. [6] veröffentlichten 1977 die Ergebnisse einer 7-jährigen Längsschnittstudie (1968–1975) unter 1642 Exponierten einer englischen Waschmittelfabrik. Im Laufe der Studie wiesen 53 (3,2%) der Beschäftigten respiratorische Beschwerden nach der Exposition gegenüber *Bacillus subtilis*-Proteasen auf. Bei 288 (17,5%) der Exponierten konnte während dieses Zeitraums eine Reaktion im Haut-Pricktest mit Alcalase beobachtet werden. 81% der Hauttest-Positiven übten ihre Tätigkeit in Arbeitsbereichen mit hoher Enzymstaubkonzentration aus. Während der 7-jährigen Studie wurden 248 Seren exponierter Arbeiter im RAST auf das Vorhandensein Alcalase-spezifischer IgE-Antikörper getestet; dies führte in 64 Fällen (26%) zu einem positiven Resultat, wobei eine gute Korrelation zwischen den Hauttest- und den RAST-Ergebnissen bestand.

Newhouse u. Mitarb. [7] berichteten über ihre Studie unter 271 Mitarbeitern einer britischen Reinigungsmittelfirma. Im Haut-Pricktest mit einer 1 bzw. 5%igen Alcalase-Lösung ergab sich bei 57 (21%) der Probanden ein positives Ergebnis. Von diesen klagten 42 (74%) über Atemwegsbeschwerden und weitere 10 (17,5%) über nasale Irritationen. Von den 214 im Hauttest Negativen gaben jedoch auch 75 (35%) Atemwegsbeschwerden an.

121 Mitarbeiter einer britischen Waschmittelfirma nahmen an einer Studie teil, nachdem fünf Angestellte an respiratorischen Beschwerden nach der Exposition gegen *Bacillus subtilis*-Enzyme litten [8]. Insgesamt gaben 77 (64%) der Exponierten Rhinitis/Konjunktivitis, 17 (14%) Husten und 41 (34%) Atemwegsbeschwerden im Zusammenhang mit der Enzymstaubexposition

Tab. 2 Klinische Untersuchungen, die die atemwegssensibilisierende Wirkung von Subtilisin belegen

Literatur	Untersuchte (n)	Symptome, Diagnosen % ARKH	Nachweismethode		IgE-Ak % (N/n)	Provokation % (N/n)
			Hauttest % (N/n)			
4	28	89% A	Prick, 71% (20/28) Alcalase, Maxatase; 1 mg/ml		–	–
5	3	100% A	Prick, 100% (3/3) Alcalase, Maxatase; 0,1 – 10 mg/ml		–	100% (3/3)
6	1642	3,2% A	Prick, 18% (288/1642) kommerzielle Enzymlösung		26% (64/248), RAST	–
7	271	43% A	Prick, 21% (57/271) Alcalase, 1–5%		–	–
8	121	34% A, 64% RK, 14% H	Prick, 40% (48/121) Alcalase, Maxatase; 0,1 – 10 mg/ml		–	–
9	38	100% A	intrakutan, 66% (25/38) Subtilisin; 0,1 mg/ml		–	90% (9/10) 0,5 ml; 0,001 – 1 mg/ml; 5 min
10 (Fabrik A)	50	26% A	intradermal, 34% (17/50) 0,01 – 0,1 mg/ml		–	–
10 (Fabrik B)	60	22% A	Prick, 35% (21/60) 10 mg/ml		–	–
11	98	50% A	Prick, 64% (51/80) Alcalase; 1 mg/ml Intradermal, 34% (27/80) Alcalase; 0,05 mg/ml		–	–
12	667	3,3% A, R, H	–		Alcalase: 4,5% (30/667) Esperase: 4,6% (31/667), RAST	–
13	13	?	–		25% (3/13), RAST	–
14	1	A, K, H	Prick, 100% (1/1) Subtilisin; 0,01 – 1 mg/ml		100% (1/1), RAST	100% (1/1) Subtilisin-haltiger Reiniger; 0,19%, 50 min
15	1064	5% A 3% R	–		Alcalase: 16% (128/799) Esperase: 22% (144/653), RAST	–
16	1	R, K, Haut	Prick, 100% (1/1) kommerzielle Maxatase		Maxatase, Savinase und Alcalase 100% (1/1), CAP	–
17	40	47% A	Prick, 20% (8/40) Esperase; Maxapem; 0,1 mg/ml		Esperase, Maxapem; 100% (8/8) RAST	83% (5/6) bzw. *17% (1/6)

Abkürzungen und Fußnoten: % Prozent der Positiven (N/n absolute Zahl der pos. Reaktionen bezogen auf die Zahl der Untersuchten) arbeitsplatzbezogene Symptome: ARKH Atemwegsbeschwerden und/oder Rhinitis und/oder Konjunktivitis und/oder Husten Bei der Provokation handelt es sich um bronchiale Provokationen, wenn nicht durch *(nasale Provokation) indiziert

an. Im Haut-Pricktest ergab sich, dass 64% (16 v. 25) der Atopiker, jedoch lediglich 33% (32 v. 96) Nicht-Atopiker eine positive Reaktion auf Alcalase und/oder Maxatase (0,1 – 10 mg/ml) zeigten. Im Lungenfunktionstest wurde bei 21 von 48 (44%) Sensibilisierten, jedoch nur bei 10 von 73 (14%) Nicht-Sensibilisierten eine Erniedrigung von FEV₁/FVC registriert.

Etwa vier Jahre nach dem erfolgreichen Einsatz von Proteasen in der Reinigungsmittelherstellung in Europa fanden die Enzyme auch in den USA Anwendung. Franz u. Mitarb. [9] berichten, dass ca. ein Jahr nach Beginn der Verwendung von Proteasen aus *B. subtilis* bzw. *B. licheniformis* in einem amerikanischen Betrieb zur Herstellung von Reinigungsmitteln einige Arbeiter in Verbindung mit der Enzymstaubexposition über Beschwerden an den oberen und unteren Atemwegen klagten. In ihrer Studie untersuchten sie 38 der symptomatischen Beschäftigten. Im Intrakutantest unter Verwendung von jeweils 0,02 ml der entsprechenden Subtilisinlösungen (0,1 mg/ml PBS, pH 7,2) zeigten 25 Personen (66%) nach 15–20 min eine positive Reaktion. Der passive Transfer der Seren von fünf im Hauttest deutlich positiven Probanden auf nicht-exponierte Kontrollpersonen führte in allen Fällen nach 48 Stunden zu einem positiven Intrakutantest bei den Kontrollen. Die Reaktionen blieben aus, wenn die transferrten Seren zuvor 30 min. lang auf 56 °C erhitzt worden waren.

Präzipitierende Subtilisin-spezifische Antikörper waren mittels Ouchterlony-Test bei 48% von 25 exponierten und bei 29% von 41 nicht-exponierten Personen nachweisbar. Im bronchialen Provokationstest (5 min., 0,5 ml vernebelte Subtilisinlösung, Konz.: 0,001 – 1 mg/ml) trat bei 9 von 10 getesteten symptomatischen Personen (90%) eine Soforttypreaktion auf, wohingegen die Provokationen der 5 Kontrollpersonen negativ verlief.

Ebenfalls 1971 wurden die Ergebnisse einer Studie über Enzymstaubexponierte in zwei amerikanischen Waschmittelfabriken publiziert [10]. Von 125 Beschäftigten der Fabrik A nahmen 50, von 486 Beschäftigten der Fabrik B 60 an der Studie teil. Von den Studienteilnehmern, die jeweils in drei Expositionsgruppen (hoch, mittel, niedrig) eingeteilt wurden, klagten 26% (A) bzw. 22% (B) über respiratorische Beschwerden. Hauttests wurden in Fabrik A intradermal (0,01 – 0,1 mg/ml), in Fabrik B als Pricktest (10 mg/ml) durchgeführt. In beiden Fällen zeigte sich eine auffallend hohe, dosisabhängige Prävalenz. So waren in Fabrik A in der hochexponierten Gruppe 9 von 20 (45%), in der mittelexponierten Gruppe 8 von 15 (53%), in der niedrigexponierten Gruppe dagegen kein Test positiv. In Fabrik B zeigten 11 von 21 (52%) Personen der hochexponierten Gruppe, 7 von 20 (35%) in der mittelexponierten Gruppe und 3 von 19 (16%) in der niedrigexponierten Gruppe im Hauttest ein positives Ergebnis.

Mitchell und Gandevia [11] publizierten 1971 die Ergebnisse einer Querschnittstudie in einer Reinigungsmittelfirma. 49 der 98 (50%) Studienteilnehmer klagten über Beschwerden im unteren Respirationstrakt. Im Haut-Pricktest mit Alcalase (1 mg/ml) zeigten 51 von 80 (64%), im Intrakutantest (0,05 mg/ml) 27 von 80 (34%) eine positive Reaktion. Lediglich zwei der im Intrakutantest Positiven waren im Pricktest negativ.

In einer 1981 veröffentlichten skandinavischen Längsschnittstudie [12] wurden insgesamt 667 in der Subtilisin-Produktion (Esperase und Alcalase) Tätige untersucht. Im Verlauf der 10jährigen Studie (1970–1980) klagten 3,3% der Beschäftigten über arbeitsplatzbezogene Beschwerden wie Rhinitis, Husten und Atemnot. Esperase-spezifische IgE-Antikörper konnten bei 31 Exponierten (4,6%) mittels RAST nachgewiesen werden. Mit einer Ausnahme wiesen diese Personen auch IgE-Antikörper gegen Alcalase auf.

Ob auch die seit einiger Zeit in der Waschmittelindustrie eingesetzten granulierten Bacillus-Enzyme atemwegssensibilisierend wirken, sollte in einer amerikanischen Studie mit 13 exponierten, 2 früher exponierten und 9 nicht-exponierten Beschäftigten untersucht werden [13]. Mittels RAST wurden bei 3 (25%) exponierten Probanden spezifische IgE-Antikörper gegen Bacillus-Enzyme nachgewiesen, jedoch bei keinem der früher exponierten bzw. der Nicht-Exponierten.

In einem Fallbericht beschreiben Lemiere u. Mitarb. [14] einen 41jährigen Angestellten, der im Rahmen seiner beruflichen Tätigkeit medizinische Geräte mittels einer Subtilisin-haltigen Lösung (Klenzyme) reinigte. Etwa ein Jahr nach Arbeitsaufnahme entwickelte er am Arbeitsplatz Husten, Konjunktivitis und Atemwegsbeschwerden; an den Wochenenden und während des Urlaubs war er beschwerdefrei. Im Provokationstest mit Methacholin kam es zu einem signifikanten FEV₁-Abfall im Sinne eines hyperreaktiven Bronchialsystems. Im Haut-Pricktest wurden Subtilisinlösungen verschiedener Konzentrationen (0,01–1 mg/ml) eingesetzt, die alle zu einem positiven Ergebnis führten. Hinsichtlich Subtilisin-spezifischer IgE-Antikörper im Serum des Patienten wurde mittels RAST ein Bindungswert von 31,7% erzielt (Werte ab 5,7% = positiv). In einem mit dem relevanten Subtilisin-haltigen Reiniger (0,19%ige Lösung über 50 min.) durchgeführten spezifischen bronchialen Provokationstest kam es zu einer ungewöhnlichen isolierten Spätreaktion. Nach 4 Stunden war der maximale FEV₁-Abfall von 25% erreicht.

In einer retrospektiven Follow-up-Studie werteten Johnsen u. Mitarb. [15] die Daten von 1064 in der Enzymproduktion Tätigen aus. Innerhalb von 3 Jahren klagten 5% der Beschäftigten über asthmatische und 3% über rhinitische Beschwerden, in einigen Fällen auch über Urtikaria in Verbindung mit der Enzymstaubexposition am Arbeitsplatz. Spezifische IgE-Antikörper (RAST) gegen Alcalase wiesen 16% von 799, gegen Esperase 22% von 653 Getesteten auf. Haut- und Provokationstests wurden nicht durchgeführt.

Über Beschwerden (Rhinokonjunktivitis, Urtikaria) beim Umgang mit pulverisierten *Bacillus subtilis*-Enzymen bei einer Laborassistentin berichten Kempf u. Mitarb. [16]. Der Pricktest mit kommerzieller Maxatase-Lösung verlief ebenso wie der Nach-

weis spezifischer IgE-Antikörper (CAP-Test) gegen Maxatase, Savinase und Alcalase positiv.

Eine Querschnittuntersuchung unter 40 exponierten Beschäftigten einer Waschmittelfirma und 36 nicht-exponierten Kontrollen führten Vanhanen u. Mitarb. durch [17]. Von den Exponierten gaben bei einer Befragung 47%, von den Nicht-Exponierten 11% respiratorische Beschwerden am Arbeitsplatz an. Im Haut-Pricktest (Proteinkonzentration 0,1 mg/ml) zeigten 8 Exponierte (20%), jedoch keiner der Kontrollprobanden eine Reaktion auf die *Bacillus subtilis*-Proteasen Esperase und Maxapem. In allen Serien der Hauttest-Positiven, die unter arbeitsplatzbezogener Rhinitis (n = 8) bzw. Asthma (n = 1) litten, konnten mittels RAST spezifische IgE-Antikörper nachgewiesen werden. In 5 von 6 Fällen wurde die Proteasesensibilisierung durch eine spezifische nasale, in einem Fall durch eine bronchiale Provokation bestätigt.

In einem Meerschweinchenmodell konnte gezeigt werden, dass sowohl bei passiver kutaner Anaphylaxie als auch bei inhalativer Exposition signifikant höhere Antikörper-Titer gegen die ebenfalls in der Reinigungsmittelindustrie verwendeten Enzyme α -Amylase und Lipase induziert wurden, wenn man diese zusammen mit einer Protease (z. B. Alcalase, Savinase) verabreichte [18].

Schlussfolgerung

Durch eine größere Zahl von Studien sind Fälle von spezifischer Überempfindlichkeit der Atemwege oder Lunge durch bakterielle Proteasen (Subtilisine) gut belegt (Übersicht s. Tab. 2). Da Symptome, Hauttestergebnisse, der Nachweis spezifischer IgE-Antikörper und die Ergebnisse spezifischer Provokationsteste in der Regel gut übereinstimmen, ist ein immunologischer Wirkmechanismus gesichert. Auch die in der letzter Zeit bevorzugt eingesetzten granulierten Enzympräparate scheinen keinen verlässlichen Schutz vor einer Atemwegssensibilisierung zu bieten. Zusätzlich geben tierexperimentelle Daten Anlass zu der Vermutung, dass die Inhalation von Protease-haltigen Stäuben die atemwegssensibilisierende Wirkung anderer in der Reinigungsmittelindustrie eingesetzter Enzyme verstärkt.

Literatur

- Baur X, Sander I, van Kampen V. Aerogene Ezyme sind aggressive berufliche Inhalationsallergene. Dtsch Med Wochenschr 2000; 125: 912–917
- Ganesh Kumar C, Malik RK, Tiwari MP. Novel enzyme-based detergents: An Indian perspective. Curr Sci 1998; 75: 1312–1319
- Wüthrich B, Ott F. Occupational asthma due to proteases in the detergent industry. Schweiz Med Wochenschr 1969; 99: 1584–1586
- Flindt ML. Pulmonary disease due to inhalation of derivatives of *Bacillus subtilis* containing proteolytic enzyme. Lancet 1969; 1: 1177–1181
- Pepys J, Longbottom JL, Hargreave FE, Faux J. Allergic reactions of the lungs to enzymes of *Bacillus subtilis*. Lancet 1969; 1: 1181–1184
- Juniper CP, How MJ, Goodwin BF, Kinshott AK. *Bacillus subtilis* enzymes: a 7-year clinical, epidemiological and immunological study of an industrial allergen. J Soc Occup Med 1977; 27: 3–12
- Newhouse ML, Tagg B, Pocock SJ, McEwan AC. An epidemiological study of workers producing enzyme washing powders. Lancet 1970; 1: 689–693
- Greenberg M, Milne JF, Watt A. Survey of workers exposed to dusts containing derivatives of *Bacillus subtilis*. Br Med J 1970; 2: 629–633

- ⁹ Franz T, McMurrain KD, Brooks S, Bernstein IL. Clinical, immunologic, and physiologic observations in factory workers exposed to *B. subtilis* enzyme dust. *J Allergy* 1971; 47: 170–180
- ¹⁰ Weill H, Waddell LC, Ziskind M. A study of workers exposed to detergent enzymes. *JAMA* 1971; 217 (4): 425–433
- ¹¹ Mitchell CA, Gandevia B. Respiratory symptoms and skin reactivity in workers exposed to proteolytic enzymes in the detergent industry. *Am Rev Respir Dis* 1971; 104: 1–12
- ¹² Zachariae H, Hoech-Thomsen J, Witmeur O, Wide L. Detergent enzymes and occupational safety. Observations on sensitization during Esperase production. *Allergy* 1981; 36: 513–516
- ¹³ Liss GM, Kominsky JR, Gallagher JS, Melius J, Brooks SM, Bernstein IL. Failure of enzyme encapsulation to prevent sensitization of workers in the dry bleach industry. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 73: 348–355
- ¹⁴ Lemiere C, Cartier A, Dolovich J, Malo JL. Isolated late asthmatic reaction after exposure to a high-molecular-weight occupational agent, subtilisin. *Chest* 1996; 110: 823–824
- ¹⁵ Johnsen CR, Sorensen TB, Ingemann Larsen A, Bertelsen Secher A, Andreassen E, Kofoed GS, Fredslund Nielsen L, Gyntelberg F. Allergy risk in an enzyme producing plant: a retrospective follow-up study. *Occup Environ Med* 1997; 54: 671–675
- ¹⁶ Kempf W, Oman H, Wuthrich B. Allergy to proteases in medical laboratory technicians: A new occupational disease? *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 700–701
- ¹⁷ Vanhanen M, Tuomi T, Tiikkainen U, Tupasela O, Voutilainen R, Nordman H. Risk of enzyme allergy in the detergent industry. *Occup Environ Med* 2000; 57: 121–125
- ¹⁸ Sarlo K, Ritz HL, Fletcher ER, Schrotel KR, Clark ED. Proteolytic detergent enzymes enhance the allergic antibody responses of guinea pigs to nonproteolytic detergent enzymes in a mixture: implications for occupational exposure. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100: 480–487