

# ***Clinical and Technical Review***

## **TRAP5b**

Aktive Isoform 5b der tartratresistenten sauren Phosphatase

Ein Biomarker für osteoklastische  
Knochenresorptionsaktivität

Knochenresorption bei Niereninsuffizienz

*always your partner*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Hintergrundinformationen zum TRAP5b</b> .....	<b>4</b>
1.1 TRAP5b Einleitung .....	4
1.2 Anwendungen und diagnostische Bedeutung von TRAP5b-Markern .....	4
1.3 Der neue Quidel® TRAP5b-spezifische Immunoassay .....	5
<b>2. Der Quidel® TRAP5b Assay</b> .....	<b>6</b>
2.1 TRAP5b Assay-Design und -Testprotokoll .....	6
2.2 Spezifität des TRAP5b-Assays .....	6
2.3 Leistungsmerkmale des TRAP5b-Assays .....	7
2.3.1 Sensitivität .....	7
2.3.2 Präzision .....	7
2.3.3 Wiederfindung .....	7
2.3.4 Linearität .....	7
2.3.5 Störsubstanzen .....	7
2.4 TRAP5b-Stabilität in Proben .....	8
2.5 Tagesrhythmische und ernährungsbedingte Schwankungen von TRAP5b .....	8
2.6 Altersabhängige Werte und Referenzbereich von TRAP5b bei gesunden Männern und Frauen ..	9
2.7 Quidel® TRAP5b im Vergleich zu BoneTrap® .....	9
2.7.1 Kreuzreaktion mit TRAP5a und Fragment-Interferenz .....	10
2.7.2 Klinischer Vergleich .....	10

<b>3. Klinische Daten - Quidel® TRAP5b Assay</b> .....	<b>11</b>
3.1 TRAP5b im Vergleich zu anderen Biomarkern für Osteoporose .....	11
3.1.1 Referenzbereiche .....	11
3.1.2 Korrelation mit anderen Knochenmarkern .....	11
3.2 TRAP5b bei Osteoporose und Therapie .....	12
3.2.1 Nachweis erhöhter Knochenresorption .....	12
3.2.2 Response auf Alendronat-Therapie .....	12
3.2.3 Response auf Risedronat-Therapie .....	13
3.2.4 Response auf Raloxifen-Therapie .....	13
3.3 TRAP5b in Patienten mit Nierendysfunktion .....	14
3.3.1 Hämodialyse-Patienten .....	15
3.3.2 Prädialyse-Patienten mit chronischer Nierenerkrankung (CKD) .....	16
3.3.3 Kinder mit chronischer Nierenerkrankung (CKD) .....	16
3.4 TRAP5b als Knochen-Resorptionsmarker bei Krebspatienten .....	17
3.4.1 TRAP5b bei Mammakarzinom .....	17
3.5 Krankheitsbilder mit Entkoppelung von Knochenresorption und Anzahl der Osteoklasten .....	17
<b>4. Technische Zusammenfassung des Quidel® TRAP5b-Assays</b> .....	<b>18</b>
<b>5. Literaturreferenzen</b> .....	<b>19</b>

**Abkürzungen:** Die meisten Abkürzungen sind allgemeiner Standard und werden im Text erklärt. In einigen Grafiken und Studien wird der neue Quidel TRAP5b-Assay als FAICEA bezeichnet: **F**ragments **A**bsorbed **I**mmunocapture **E**nzymatic **A**ssay. Da der Quidel Assay nur enzymatisch intaktes TRAP5b bestimmt, wird er auch als 'intakter TRAP5b' bezeichnet.

**Autor:**

Peter Haima, Ph.D.  
03/2009

# 1. Hintergrundinformationen zum TRAP5b

## 1.1 TRAP5b Einleitung

TRAP5 (serum band 5 tartrate-resistant acid phosphatase) ist eine von sieben sauren Phosphatasen, die in hämatopoetischem Gewebe auftreten; es ist eines der am häufigsten vorkommenden Enzyme in Osteoklasten. TRAP5 ist ein 37 kDa schweres Glykoprotein, das in zwei Isoformen 5a und 5b vorhanden ist. TRAP5b, die aktive Isoform von TRAP, wird speziell durch knochenresorbierende Osteoklasten synthetisiert, während TRAP5a aus Makrophagen und dendritischen Zellen stammt. TRAP5b besitzt zwei enzymatische Aktivitäten; sie dient als Phosphatase bei saurem pH und generiert reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bei neutralem pH. Es wird vermutet, dass durch TRAP5b erzeugte ROS am Abbau von endozytierten Knochenmatrixprodukten in resorbierenden Osteoklasten beteiligt sind.

Hohe Serum-Konzentrationen von TRAP5b, jedoch nicht 5a, stehen normalerweise in Verbindung mit Knochenremodelling und werden oft während des normalen Knochenwachstums bei gesunden Kindern beobachtet. Erhöhte Serum-TRAP5b-Konzentrationen wurden bei Krankheiten nachgewiesen, die durch eine verstärkte Knochenresorption gekennzeichnet sind, wie beispielsweise Morbus Paget der Knochen, Hämodialyse, primärer Hyperparathyreoidismus und die Knochenresorption beeinflussende metastatische Tumore. Unbehandelte postmenopausale Frauen weisen höhere Konzentrationen an Serum-TRAP5b auf als postmenopausale Frauen, die sich einer Östrogensatztherapie unterziehen. Eine spezifische Bestimmung des TRAP5b-Enzyms wurde deshalb seit vielen Jahren als potenziell hilfreich als Marker für die Knochenresorptionsrate angesehen.

Die Entwicklung von TRAP5b-spezifischen Assays wurde jedoch durch hohe Konzentrationen der sehr ähnlichen TRAP5a-Isoform und inaktiver TRAP5-Fragmente im Serum erschwert. Da frühere Assays das Gesamt-TRAP5 erfassen und ihre spezifische Wirksamkeit zur Messung einer bestimmten Isoform schwankt, wurde ein neuer Assay unter Verwendung von TRAP5b-spezifischen monoklonalen Antikörpern entwickelt, wobei Störungen durch TRAP5a und inaktive TRAP5-Fragmente ausgeschlossen werden und nur enzymatisch aktives intaktes TRAP5b nachgewiesen wird.

## 1.2 Anwendungen und diagnostische Bedeutung von TRAP5b-Markern

TRAP5b ist hochspezifisch für Osteoklasten *in vivo*, obwohl nachgewiesen wurde, dass es unter bestimmten Bedingungen von alveolaren Makrophagen sezerniert wird. Als Knochenmarker ist TRAP5b einzigartig insoweit, als es die Anzahl der Osteoklasten widerspiegelt, und da Veränderungen in der Knochenresorption gewöhnlich mit Veränderungen in der Anzahl der Osteoklasten zusammenhängen, ist TRAP5b ein nützlicher Indikator für die Knochenresorption.

TRAP5b steht in keinem spezifischen Zusammenhang mit dem Osteoklasten-vermittelten Kollagenabbau; vielmehr wird TRAP5b von aktiven Osteoklasten sekretiert, gleichgültig ob sie Knochensubstrat metabolisieren oder nicht. Bei bestimmten Krankheitsbildern, bei denen die Knochenresorption und die Anzahl der aktiven Osteoklasten entkoppelt sind, kann dies von großer Bedeutung sein. TRAP5b-Daten können zudem hilfreich für die Bewertung anderer Resorptionsdaten sein, die auf einen Anstieg der Anzahl der aktiven Osteoklasten hindeuten.

Im Allgemeinen korrelieren *in-vivo*-TRAP5b-Daten stark mit anderen Knochenresorptionsmarkern, einschließlich DPD, NTX und CTX. Als serologischer Knochenresorptionsmarker besteht eine erhebliche Synergie mit Knochenaufbaumarkern, insbesondere BAP. Es kann deshalb vorteilhaft sein, BAP und TRAP5b unter Verwendung desselben Probenotyps (Serum) zu messen und zu beurteilen.

**TRAP5b gilt als wichtigster Marker für die Knochenresorptionsrate bei Patienten mit Nierenversagen. Knochenstoffwechselmarker wie CTX, NTX, BAP und Osteocalcin kumulieren im Blut, da die Marker nicht durch die dysfunktionale Niere ausgeschieden werden. Dies kann zu erhöhten Markerkonzentrationen bei renaler Osteodystrophie führen, einer Knochenkrankheit, von der die Mehrheit der Patienten, die an Nierenversagen leiden, betroffen sind und dies verursacht eine Fehlinterpretation der Knochenmarker-Ergebnisse.**

**TRAP5b wird während der Zirkulation rasch inaktiviert und vor der Ausscheidung aus dem Blutkreislauf über die Leber in Fragmente abgebaut. Daher hat die Nierendysfunktion keine Auswirkung auf enzymatisch aktive intakte TRAP5b-Konzentrationen. Sogar bei Leberversagen werden inaktive Fragmente im Blut akkumuliert, während enzymatisch aktive intakte TRAP5b-Moleküle nicht akkumuliert werden.**

**Serum-TRAP5b weist geringe Schwankungen über den Tag auf. Dies ist ein großer Vorteil gegenüber anderen Serum- und Urin-Markern, die eine Veränderung von bis zu 137 % über den Tag aufweisen. TRAP5b zeigt auch eine minimale Reaktion auf Fasten, während andere Serum- und Urinmarker wie CTX um bis zu 18 % während des Fastens abnehmen. Aufgrund seines geringen biologischen Rauschens kann das Signal-Rausch-Verhältnis von TRAP5b in Krankheits- und Therapiesituationen in der Tat größer sein als bei CTX und Telopeptiden im Urin.**

Es wurde zudem nachgewiesen, dass TRAP5b auf eine anti-resorptive Therapie anspricht und TRAP5b wurde als potenziell nützlich für den Nachweis von Knochenmetastasen bei einigen Krebsarten beschrieben.

### **1.3 Der neue Quidel® TRAP5b-spezifische Immunoassay**

Mehrere Probleme haben die Entwicklung von TRAP5b-spezifischen Assays bisher erschwert. Dazu gehören:

- die Anwesenheit anderer, ähnlich störender saurer Phosphate
- die Anwesenheit von zwei sehr ähnlichen TRAP5-Isoformen, 5a und 5b; TRAP5a ist nicht knochenspezifisch und liegt bei Erwachsenen in weitaus höheren Konzentrationen als TRAP5b vor
- die hohe Konzentration von inaktiven TRAP5-Fragmenten im Serum

Traditionelle TRAP-Assays sind durch die Abwesenheit von TRAP5b-spezifischen Antikörpern eingeschränkt und erfassen somit Gesamt-TRAP5: TRAP5a, TRAP5b und inaktive Fragmente. Dies ist eine entscheidende Einschränkung, denn umfangreiche Forschungsarbeiten haben gezeigt, dass die TRAP5a-Isoform nicht mit dem Knochenumsatz in Zusammenhang steht und in Proben von älteren Patienten und Patienten mit rheumatoider Arthritis wesentlich erhöht sein kann. Darüber hinaus können bis zu 90 % der zirkulierenden TRAP-Enzyme als inaktive Fragmente vorliegen [20, Igarashi]. Um die limitierte Spezifität zu umgehen, selektieren diese Assays die TRAP5b-Aktivität aus der gesamten erfassten TRAP5 unter Verwendung eines Substrat-pH, bei dem TRAP5b aktiv und die TRAP5a-Aktivität um das 5-fache vermindert ist. In einer Studie über saure Phosphatasen als Knochenmarker weisen Igarashi et al. [20] darauf hin, dass dies ein Problem sein könnte, insbesondere für Proben von älteren Patienten, die normalerweise höhere zirkulierende Konzentrationen von TRAP5a-Aktivität aufweisen.

Der neue Quidel® TRAP5b-Assay verwendet zwei einzigartige Antikörper und ein spezielles Assay-Design, um eine TRAP5a-Kreuzreaktion und eine Interferenz durch inaktive Fragmente wirksam zu eliminieren. Ein monoklonaler Antikörper ist hochspezifisch für inaktive TRAP5b-Fragmente, so dass mehr aktive TRAP5b für die TRAP5b-spezifischen monoklonalen Antikörper im Assay zur Verfügung stehen. Das neuartige **Fragment Absorbed Immuncapture Enzyme Assay System (FAICEA)** bietet eine verbesserte spezifische Wirksamkeit für TRAP5b, einen breiteren dynamischen Bereich, akzeptiert eine größere Bandbreite von Probenarten und benötigt ein geringeres Probenvolumen im Vergleich zu traditionellen TRAP5-Assays.

## 2. Der Quidel® TRAP5b Assay

### 2.1 TRAP5b Assay-Design und -Testprotokoll

Der Quidel® TRAP5b-Assay verwendet zwei einzigartige Antikörper und ein spezielles Assay-Design, um eine TRAP5a-Kreuzreaktion und Interferenz durch inaktive Fragmente wirksam zu eliminieren. Monoklonale Antikörper Trk49 und Trk62 wurden durch die Immunisierung von gereinigtem TRAP5b aus menschlichen Knochen entwickelt. Der erste Antikörper, Trk49, ist hochspezifisch für inaktive TRAP5b-Fragmente. Der zweite Antikörper, Trk62, ist hochspezifisch für intakte, aktive TRAP5b. Trk49 bindet inaktive TRAP5b-Fragmente; dadurch steht mehr Trk62 für die Bindung von aktivem TRAP5b in der Mikrovertiefung zur Verfügung. **Dieses innovative Assay-Design wird in der wissenschaftlichen Literatur oft als FAICEA bezeichnet: Fragments Absorbed Immunocapture Enzymatic Assay.** Assay-Design und Protokoll sind in Abbildung 1 dargestellt.

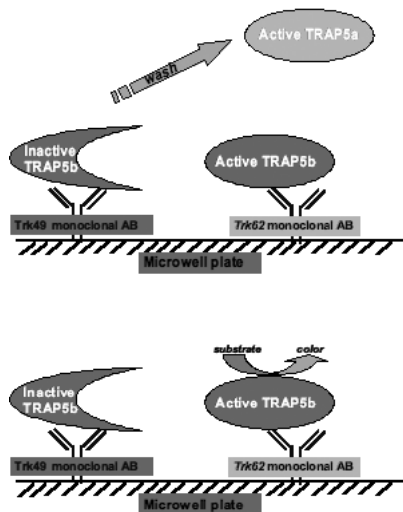


Abb. 1

### Quidel TRAP5b

#### Assay-Design & -Verfahren

1. 100 µl Probenverdünnungs-Puffer und 50 µl Probe in Assay-Vertiefungen geben.
2. 60 Minuten bei 18–28 °C inkubieren (Schüttler).
3. 3-Mal mit Waschpuffer waschen.
4. 100 µl Substratlösung in jede Vertiefung geben.
5. 60 Minuten bei 37 °C inkubieren.
6. 50 µl Stopplösung hinzufügen.
7. Die optische Dichte bei 405 nm messen.
8. Die Assayergebnisse auswerten.

### 2.2 Spezifität des TRAP5b-Assays

Interferenzen durch TRAP5a sind ein großes Problem bei TRAP5b-Konzentrationen in klinischen Situationen. Um die TRAP5b-spezifische Wirksamkeit des Quidel® TRAP5b-Assays zu demonstrieren, wurde Serum von erwachsenen Probanden mit Hilfe der Heparin-Chromatographie abgetrennt [1, Ohasi] (Fig. 2). Die verschiedenen Fraktionen wurden auf TRAP5-Aktivität getestet. Während ein kolorimetrischer Assay TRAP-Aktivität sowohl in TRAP5a- als auch TRAP5b-Fraktionen nachwies, detektierte der neue Quidel® Assay nur Aktivität in der TRAP5b-Fraktion. Dies belegt, dass das Quidel® TRAP5b-Assay-Design sehr spezifisch TRAP5b gegenüber TRAP5a favorisiert.

In einem zweiten Experiment wurden gereinigtes TRAP5a und b in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt, wobei das Gesamt-TRAP konstant blieb. Eine konstante Konzentration an TRAP-Aktivität wurde durch einen konventionellen kolorimetrischen Assay nachgewiesen; der Quidel® TRAP5b Assay ermittelte dagegen linear ansteigende TRAP5-Konzentrationen in Abhängigkeit von der zunehmenden TRAP5b-Konzentration [1] (Fig. 3). Diese Ergebnisse belegen, dass das Vorhandensein von TRAP5a-Aktivität in Proben die Messung der TRAP5b-Aktivität durch den Quidel® TRAP5b Assay nicht beeinflusst.

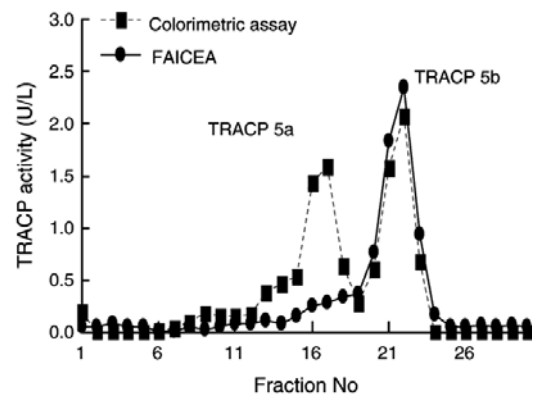


Abb. 2

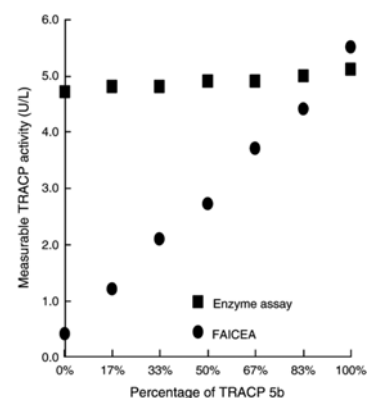


Abb. 3

## 2.3 Leistungsmerkmale des TRAP5b-Assays

### 2.3.1 Sensitivität

Die Mindestnachweisgrenze des Quidel® TRAP5b-Assays beträgt 0,2 U/l und wurde im Rahmen einer Nullstandard-Präzisionsstudie an der dreifachen Standardabweichung bestimmt.

### 2.3.2 Präzision

#### Intra-Assay (in der Serie) (n=16)

Probe	Mittel (U/l)	Standardabweichung (U/l)	% CV
Probe 1	3,4	0,07	2,2
Probe 2	7,4	0,14	1,9

#### Inter-Assay (von Serie zu Serie) (n=8)

Probe	Mittel (U/l)	Standardabweichung (U/l)	% CV
Probe 1	3,8	0,11	3,0
Probe 2	7,4	0,15	2,0

### 2.3.3 Wiederfindung

Eine Wiederfindung (engl. „spike recovery“) von 92–103 % wurde erzielt durch Zugabe einer bekannten Menge von gereinigtem TRAP5b zu Serumproben mit unterschiedlichen Konzentrationen von endogener TRAP5b.

### 2.3.4 Linearität

Die Linearität wurde durch eine serielle Verdünnungsreihe der Seren mit Probendiluent ermittelt, der gemessene Wert wurde mit den erwarteten Werten verglichen. Drei unterschiedliche Proben mit unverdünnten Werten von 3,7, 7,7 und 12,0 U/l wurden 2-, 4- und 8-fach verdünnt. Ermittelte Wiederfindung lag zwischen 95,9 bis 101,2 %.

### 2.3.5 Störsubstanzen

Die folgenden Substanzen wurden getestet und es wurden keine signifikanten Interferenzen gemessen: Hämoglobin (500 mg/dl); Bilirubin F (20 mg/dl); Bilirubin C (20 mg/dl); Lipide (Intralipid® 2500 Trübung) und Rheumafaktor (500 U/ml).

## 2.4 TRAP5b-Stabilität in Proben

Stabilitätsstudien, die mit dem Quidel® TRAP5b-Assay durchgeführt wurden, zeigen die folgende Stabilität der TRAP5b-Aktivität in klinischen Proben [2]. Die Stabilitätsergebnisse werden in Tabelle 1 dargestellt. Abbildung 4 zeigt einige typische Stabilitätsdaten für TRAP5b in Serum.

Lagerbedingungen Proben	25 °C	4 °C	-20 °C	-30 °C	-80 °C	Gefrier-/Tau-Zyklen
Vollblut	12 Stunden	12 Stunden				
Serum	8 Stunden	2 Tage	1 Monat	1 Monat	2 Jahre	3

Tabelle 1

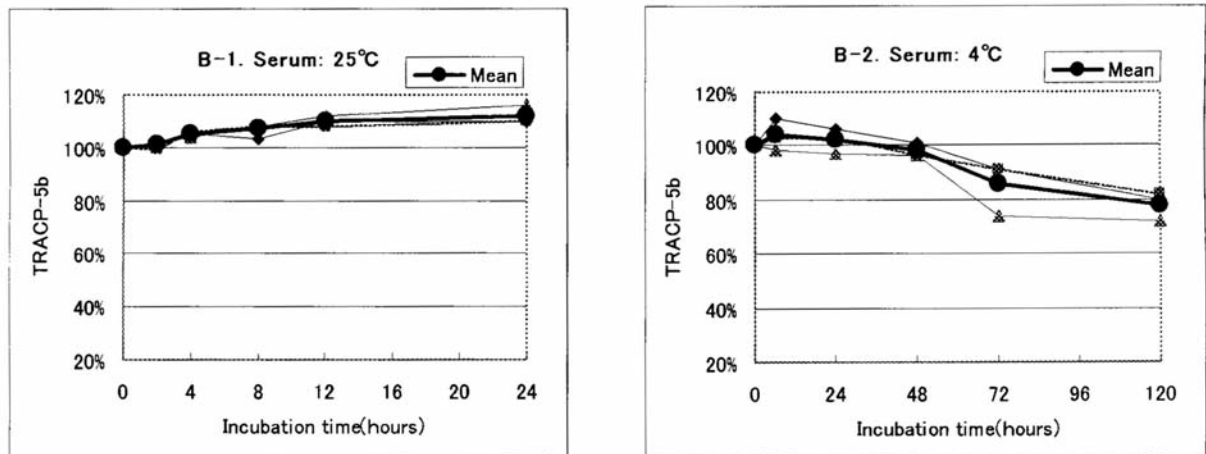
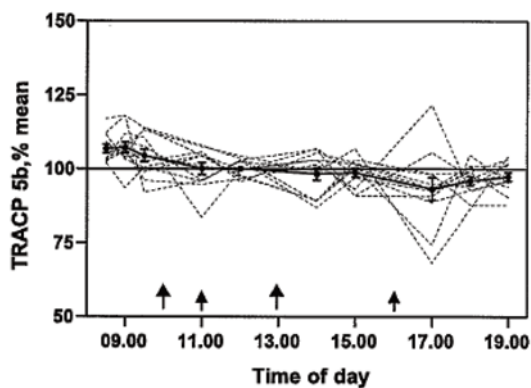


Abb. 4

## 2.5 Tagesrhythmische und ernährungsbedingte Schwankungen von TRAP5b.

Serum-TRAP5b zeigt geringe Variationen während des Tages (Abb. 5), eine geringe Variabilität von 14 % wurde zwischen 9:00 und 17:00 Uhr beobachtet. Dies ist einen großer Vorteil gegenüber anderen Resorptions-Markern, die eine Variabilität von bis zu 137 % während des Tages aufweisen [3, Hannon].

TRAP5b zeigte ebenfalls nur eine minimale Response bei Nahrungskarenz. Während die Werte anderer Urin- und Serum-Resorptionsmarker im Nüchternzustand um 17,8 % vermindert waren, wies TRAP5b nur eine Verringerung von 2,4 % auf [3].



R.A. Hannon et al. / Bone 34 (2004) 187-194

Abb. 5

## 2.6 Altersabhängige Werte und Referenzbereich von TRAP5b bei gesunden Männern und Frauen.

Abb. 6 zeigt TRAP5b-Referenzdaten in Serum von gesunden männlichen und weiblichen Probanden aus Japan. Bei Männern variierte die TRAP5b-Aktivität unabhängig vom Alter nicht signifikant. Postmenopausale Frauen wiesen signifikant höhere Serum-TRAP5b-Aktivität im Vergleich zu prämenopausalen Frauen auf; dies ist assoziiert mit einer hohen Knochenresorption. Tabelle 2A zeigt Referenzbereiche einer Studie mit japanischen Probanden [21, Nishizawa]. Tabelle 2B [6, Ganero] und Tabelle 2C [7, Demary] stellen Referenzbereiche von Studien mit europäischen Probanden dar. Tabelle 2D [Quidel] zeigt Referenzbereiche von Studien, die in den USA durchgeführt wurden.

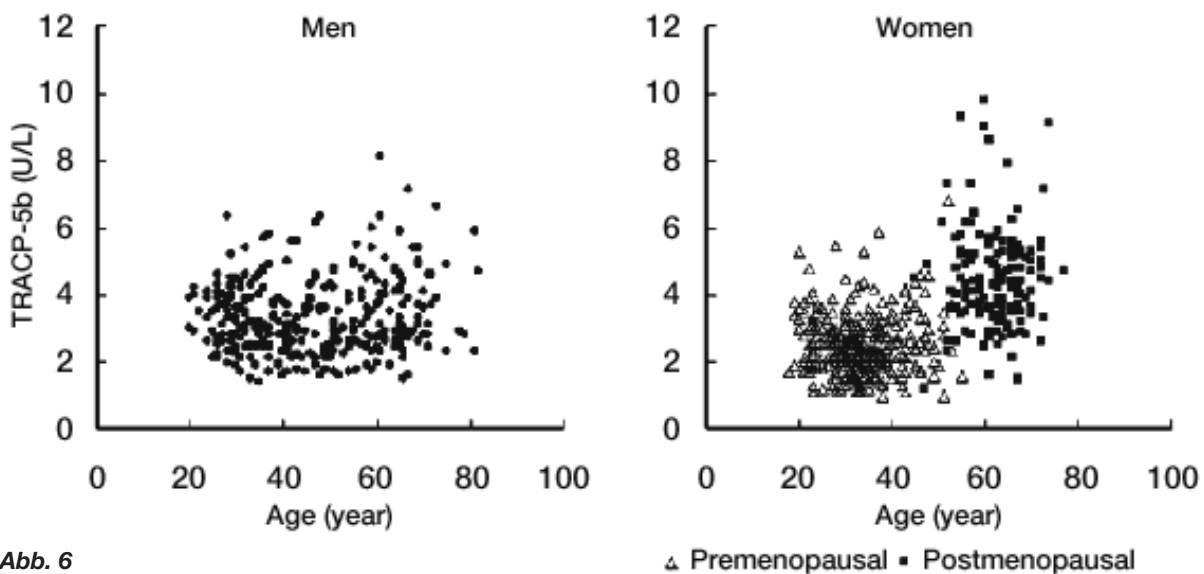


Abb. 6

Geschlecht	Alter (Jahre)	n	(U/l)	Alter (Jahre)	n	(U/l)	Alter (Jahre)	n	(U/l)	Alter (Jahre)	n	(U/l)
	<b>A - Japan</b>			<b>B - Europa</b>			<b>C - Europa</b>			<b>D - USA</b>		
Männer	25-82	309	1,7-5,9				27-76	17	1,32-2,74		43	1,34-2,48
Frauen (prämenopausal)	25-55	267	1,2-4,4	23-52	31	1,21-2,65	17-40	20	1,22-2,56		107	0,60-2,06
Frauen (postmenopausal)	45-75	151	2,5-7,6	41-59	30	2,12-4,46	60-91	19	2,27-3,01		75	1,95-3,83

Tabelle 2 A-D . Werte kalkuliert mit 1 SD

## 2.7 Quidel® TRAP5b im Vergleich zu BoneTrap®

Wie bereits zuvor erwähnt, sind traditionelle TRAP-Assays durch das Fehlen TRAP5b-spezifischer Antikörper eingeschränkt und messen deshalb Gesamt-TRAP5, sowohl 5a und 5b als auch inaktive Fragmente. Dies stellt eine schwerwiegende Limitierung dar, da TRAP5a nicht knochenspezifisch ist und inaktive Fragmente des TRAP5b in klinischen Proben substantiell erhöht sein können. Um die Einschränkung der Spezifität zu eliminieren, selektiert der BoneTrap® Assay die TRAP5b-Aktivität aus der gesamten erfassten TRAP5 unter Verwendung eines Substrat-pH, bei dem TRAP5b aktiv ist und die TRAP5a-Aktivität abnimmt. In einer Studie über saure Phosphatasen als Knochenmarker weisen Igarashi et al. [21] bereits darauf hin, dass dieser pH-Wechsel nicht die Gesamt-TRAP5a-Aktivität reduziert; dies kann ein Problem darstellen, insbesondere bei Proben von älteren Patienten, die hohe zirkulierende Konzentrationen von TRAP5a-Aktivität aufweisen.

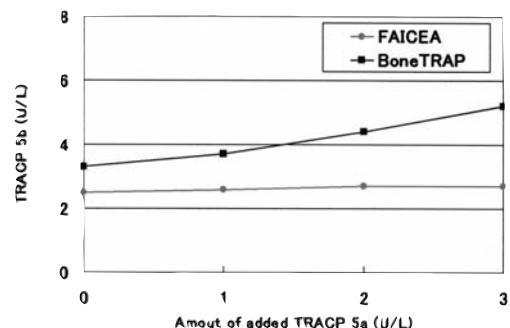
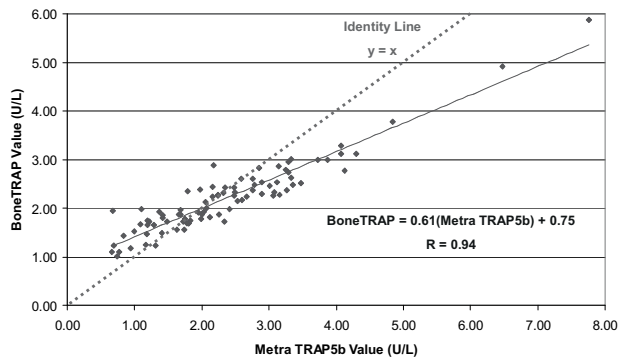


Abb. 7

## 2.7.1 Kreuzreaktion mit TRAP5a und Fragment-Interferenz

In einem Spiking-Experiment wurde die Sensitivität des Quidel® TRAP5b und des BoneTrap® bei Anwesenheit von TRAP5a simuliert [4, Mochizuki]. In einem ersten Experiment wurde normalem Humanserum eine zunehmende Menge von gereinigtem TRAP5a hinzugefügt. Wie erwartet (Abb. 8) wurden die Quidel® TRAP5b Assay-Messungen (FAICEA) durch zunehmende TRAP5a-Konzentrationen nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu stiegen die TRAP5b-Konzentrationen, die mit dem BoneTrap® gemessen wurden, um 70 %.

In einem zweiten Experiment (Ergebnisse nicht dargestellt) wurden TRAP5a-Serumproben (niedrige und mittlere TRAP-Konzentrationen) seriell mit einer Kochsalzlösung verdünnt, um eine mögliche Fragment-Interferenz zu untersuchen. Der Quidel® TRAP5b Assay erzielte eine exzellente Linearität (93–99 % Wiederfindung in höchsten Verdünnungen), während mit dem BoneTrap® stark erhöhte Werte nach der Verdünnung gemessen wurden (139–157 % Wiederfindung in höchsten Verdünnungsstufen); dies deutet auf Fragment-Interferenz in den unverdünnten Proben hin.



Zusammenfassend ist festzustellen, dass diese Experimente eindeutig belegen, dass im Vergleich zum traditionellen Assay-Konzept des BoneTrap® das Quidel® TRAP5b-spezifische monoklonale Antikörper-Konzept Interferenz durch TRAP5a und inaktive TRAP-Fragmente wirksam eliminiert.

Abb. 8

## 2.7.2 Klinischer Vergleich

In einer kürzlich durchgeführten Vergleichsstudie [5, Keso] wurden 88 einzelne Serumproben in vier Vergleichsexperimenten mit beiden Methoden untersucht. Serum-TRAP5b-Konzentrationen, die mit Quidel® TRAP5b gemessen wurden, korrelierten klar mit den Konzentrationen, die mit BoneTrap® bestimmt wurden (Abb. 9). Die Werte lagen zwischen 0,67 und 7,76 U/l für Quidel® TRAP5b und zwischen 1,01 und 5,88 U/l für BoneTrap®. Der absolute durchschnittliche Unterschied zwischen beiden Methoden betrug 22 %. Auch eine weitere Studie [ASBMR 2007] zeigte eine **gute** Korrelation der beiden Methoden bei 103 gesunden prä- und postmenopausalen Frauen.

Allerdings belegte der Vergleich der individuellen TRAP5b-Werte [6] bei prä- und postmenopausalen Frauen, dass der QUIDEL® TRAP5b Assay beim Nachweis erhöhter Knochenresorption signifikant empfindlicher war (Abb. 9). Darüber hinaus zeigte eine klinische Studie mit Frauen, die eine orale Alendronat-Behandlung erhielten, dass der QUIDEL® TRAP5b Assay auch beim Nachweis verringerter Knochenresorption aufgrund einer anti-resorptiven Therapie signifikant empfindlicher war (siehe 3.2.2).

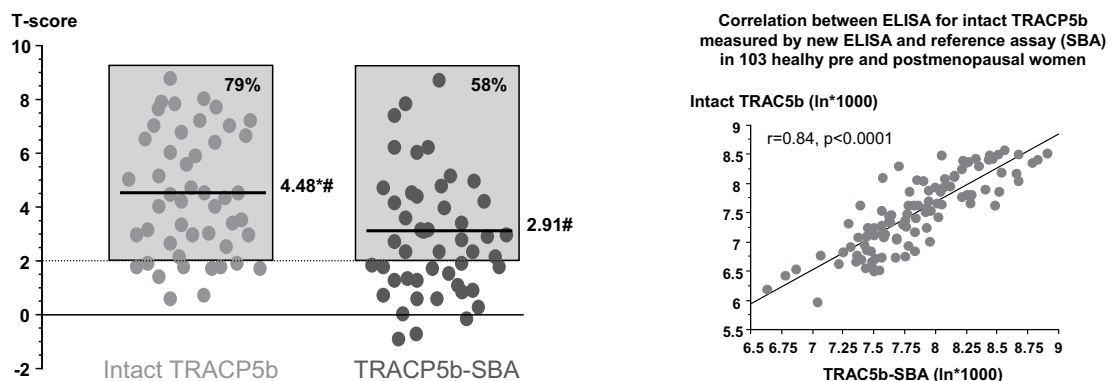


Abb. 9

### 3. Klinische Daten – Quidel® TRAP5b Assay

#### 3.1 TRAP5b im Vergleich zu anderen Biomarkern für Osteoporose

##### 3.1.1 Referenzbereiche

Normalwerte von gesunden prä- und postmenopausalen Frauen und gesunden Männern im Vergleich: TRAP5b, CTX, NTX, CICIP, PTH und Osteocalcin (Tabelle 3) [7, Demary].

Prämenopausale Frauen < 40 Jahre						
	CTX	NTX	TRAP5b	CICP*	intaktes PTH	Osteocalcin
	Serum	Serum	Serum	Serum	EDTA	Serum
	ng/ml	nmol	U/l	ng/ml	pg/ml	ng/ml
Mittel	0,37	12,61	1,89	87,45	27,40	5,22
Mittel - 2SD	0,05	6,28	0,54	28,88	-2,48	1,15
Mittel + 2SD	0,70	18,94	3,23	146,02	57,27	9,30
min.	0,10	7,58	0,93	60,00	10,51	3,00
max.	0,65	19,37	3,05	190,32	66,55	10,30

Postmenopausale Frauen > 60 Jahre						
	CTX	NTX	TRAP5b	CICP	intaktes PTH	Osteocalcin
	Serum	Serum	Serum	Serum	EDTA	Serum
	ng/ml	nmol	U/l	ng/ml	pg/ml	ng/ml
Mittel	0,43	15,53	2,64	81,25	47,98	8,40
Mittel - 2SD	0,09	8,58	1,15	44,93	3,80	2,98
Mittel + 2SD	0,76	22,48	4,14	117,58	92,16	13,80
min.	0,04	10,45	1,24	43,08	20,52	4,40
max.	0,72	22,13	4,34	109,32	104,09	14,00

Männer						
	CTX	NTX	TRAP5b	CICP	intaktes PTH	Osteocalcin
	Serum	Serum	Serum	Serum	EDTA	Serum
	ng/ml	nmol	U/l	ng/ml	pg/ml	ng/ml
Mittel	0,37	14,13	2,03	90,06	37,28	7,66
Mittel - 2SD	0,00	4,84	0,61	43,05	-6,59	4,02
Mittel + 2SD	0,74	23,43	3,45	137,07	81,15	11,30
min.	0,14	8,49	0,90	52,68	15,60	4,90
max.	0,78	23,97	3,71	132,96	102,10	12,40

Tabelle 3

\* CICP = PICP

##### 3.1.2 Korrelation mit anderen Knochenmarkern

Die Korrelation zwischen TRAP5b-NTX, TRAP5b-CTX und CTX-NTX wurde anhand von > 100 klinischen Stichproben ermittelt [7]. Eine signifikante Korrelation (Tabelle 4) war zwischen TRAP5b und Markern des Kollagen-Stoffwechsels bei Osteoklasten-vermittelter Resorption (CTX und NTX) zu beobachten. Diese Korrelation belegt, dass TRAP5b für die Bestimmung der Knochenresorption sehr nützlich ist.

Y	X	Relation	R
TRAP5b	CTX	$Y = 2,75X + 1,18$	0,83
TRAP5b	NTX	$Y = 0,09X + 0,86$	0,78
NTX	CTX	$Y = 19,9X + 6,5$	0,82

Tabelle 4

### 3.2 TRAP5b bei Osteoporose und Therapie

Bei einer Auswertung eines traditionellen TRAP5b-Assays (weniger spezifisch als der neue Quidel® TRAP5b [3, Hannon]) hatte sich bereits herausgestellt, dass die TRAP5b-Reaktion auf eine antiresorptive Therapie im Vergleich zu anderen Resorptionsmarkern schwächer war; allerdings waren die biologischen Einflüsse von Serum-TRAP5b ebenfalls viel geringer. Daher war das Signal-Rausch-Verhältnis für TRAP5b tatsächlich größer als für sCTX und erheblich größer als für Urin-Telopeptide. Dies deutet darauf hin, dass Serum-TRAP5b ein großes Potenzial besitzt, um zur Überwachung der frühen Response auf eine antiresorptive Therapie sowie zur therapeutischen Beobachtung eingesetzt zu werden.

#### 3.2.1 Nachweis erhöhter Knochenresorption

Garnero et al. verglichen die individuellen TRAP5b-Werte von prä- und postmenopausalen Frauen [6]. Eine hochsignifikante Erhöhung von Serum-TRAP5b wurde mit dem TRAP5b-Assay (Abb. 10; 174 %;  $p < 0,0001$ ) bei postmenopausalen Frauen gemessen, was mit dem erhöhten Knochenumsatz bei diesen älteren Frauen übereinstimmt.

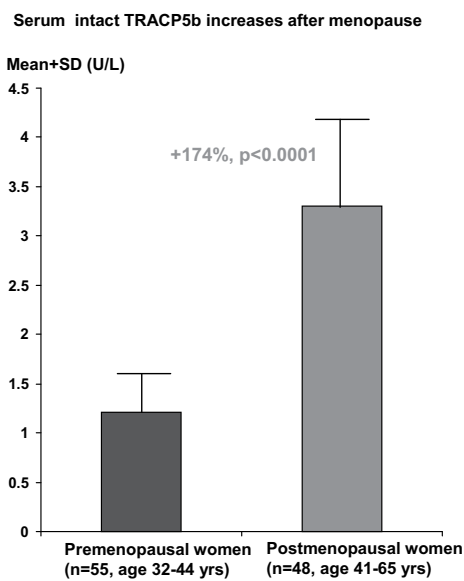


Abb. 10

#### 3.2.2 Response auf Alendronat-Therapie

In einer klinischen Studie wurde gezeigt, dass TRAP5b nach einer dreimonatigen Alendronat-Therapie eine verringerte Knochenresorption wirksam nachweisen kann [8, Nenonen] (Abb. 11). In einer weiteren Studie [6] konnte mit dem QUIDEL® TRAP5b Assay belegt werden, dass sich der Knochenumsatz bei 42 postmenopausalen, an Osteoporose erkrankten Frauen durch die Behandlung mit Alendronat verringerte (Abb. 12). Die durchschnittliche Abnahme betrug -41 % gegenüber -21 % für den BoneTrap® Assay.

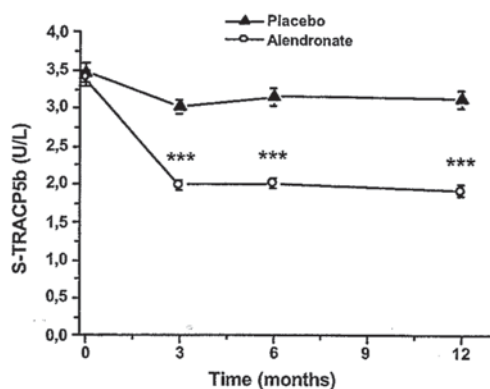
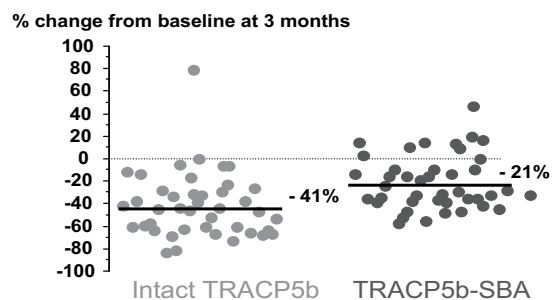


Abb. 11



The graph shows the individual percent change of serum TRACP5b measured by the new ELISA (Metra) and the reference assay (SBA) after 3 months of treatment with oral alendronate (10 mg/d) in 42 postmenopausal women with osteoporosis

Abb. 12

### 3.2.3 Response auf Risedronat-Therapie

Naka et al. [9] verabreichten 36 postmenopausalen Osteoporose-Patienten 2 Jahre lang Risedronat und bestimmten die Response der Knochenmineraldichte der Lendenwirbelsäule (LSBMD) und der Knochenmarker TRAP5b, BAP, uCTX, sNTX, uNTX, DPD und BAP. Risedronat erhöhte die LSBMD und suppressierte Knochenmarker bis zu 2 Jahren. TRAP5b und BAP waren die besten Marker für die Vorhersage der therapeutischen Wirkung auf LSBMD sowohl über kürzere als auch längere Zeiträume (Tabelle 5).

Therapeutischer Effekt auf LSBMD für die Periode 1 bis 12 Monaten				
Monat	1	3	6	12
TRACP5b	-0,419	-0,369 #	-0,454 ##	-0,609 ##
uNTX	0,214	-0,294	-0,098	-0,391 #
sNTX	-0,183	-0,305	-0,128	-0,517
DPD	-0,338	0,142	-0,066	-0,400
uCTX	-0,291	-0,298	-0,351 #	-0,390 #
BAP	-0,273	-0,512 ##	-0,603 ##	-0,654 ##

Tabelle 5

#: p < 0,05    ##: p < 0,01

### 3.2.4 Response auf Raloxifen-Therapie

Mochizuki et al. [10] behandelten 25 postmenopausale Frauen, die an Osteoporose litten, täglich mit 60 mg Raloxifen. Mehrere Knochenmarker wurden an der Basislinie und nach 1, 3 und 6 Monaten gemessen; sNTX, uNTX, DPD und TRAP5b. Die Ergebnisse (Abb. 13) belegten, dass Serum-TRAP5b-Konzentrationen nach 1, 3 und 6 Monaten durch Raloxifen signifikant reduziert waren. Der Rückgang betrug 23-28 % für Quidel TRAP5b, 14-23 % für BoneTrap®. Die Veränderung der Serum-TRAP5b-Konzentration überschritt die geringste signifikante Veränderung nach 6 Monaten bei 67 % der Testpersonen mit dem Quidel TRAP5b Assay und bei 33 % mit dem BoneTrap®. Veränderungen der Knochenmineraldichte nach 6 Monaten korrelierten signifikant mit Veränderungen der Quidel TRAP5b-Werte nach 3 Monaten (p<0,05).

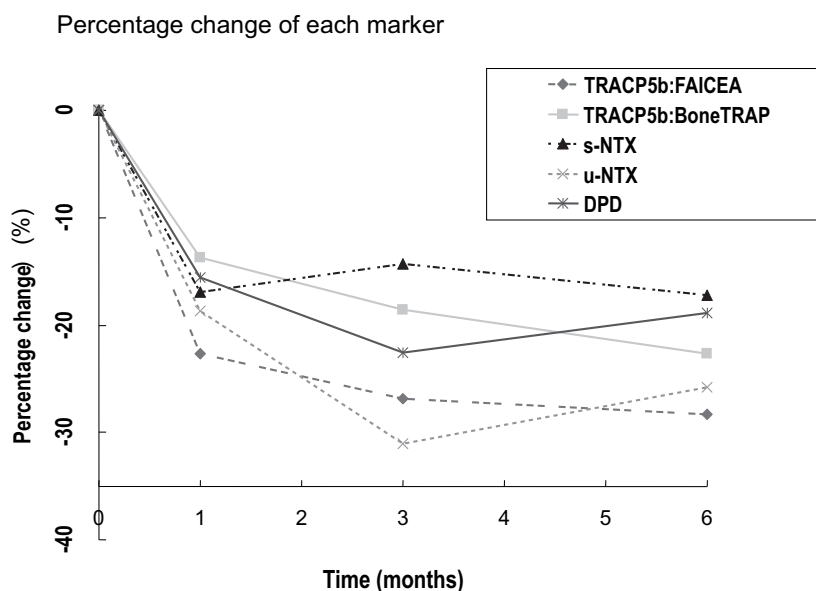


Abb. 13

Diese Ergebnisse belegen, dass der Quidel® TRAP5b ein hervorragender Knochenresorptionsassay zur Überwachung der Raloxifen-Behandlung ist.

### 3.3 TRAP5b in Patienten mit Nierendysfunktion

Die Nierenfunktion beeinflusst die Markerwerte, da die Marker über die Nieren aus dem Kreislauf ausgeschieden werden; wenn die Nierenfunktion gestört ist, werden diese Marker nicht aus dem Kreislauf ausgeschieden. Dies kann zu erhöhten Marker-Konzentrationen führen bei Bedingungen, unter denen der Knochenumsatz eigentlich normal ist. Dies ist ein ernsthaftes Problem bei der Nieren-Osteodystrophie, einer Knochenkrankung, von der die Mehrzahl der Patienten mit Nierenversagen betroffen ist, und führt zu einer Fehlinterpretation der Knochenmarker-Ergebnisse.

TRAP5b wird während der Zirkulation durch den Verlust von Eisen rasch inaktiviert und vor der Ausscheidung aus dem Blutkreislauf über die Leber in Fragmente abgebaut. Daher hat die Nierendysfunktion keine Auswirkung auf enzymatisch aktive intakte TRAP5b-Konzentrationen. Sogar bei Leberversagen werden inaktive Fragmente im Blut akkumuliert, während enzymatisch aktive intakte TRAP5b-Moleküle nicht akkumuliert werden.

Im Gegensatz dazu scheinen sich andere Marker für die Knochenresorption oder -formation wie CTX, NTX und Osteocalcin im urämischen Serum zu akkumulieren. Abb. 14 zeigt wie schnell die Inaktivierung von TRAP5b die Akkumulation aufgrund der fehlenden Nieren-Clearance eliminiert.

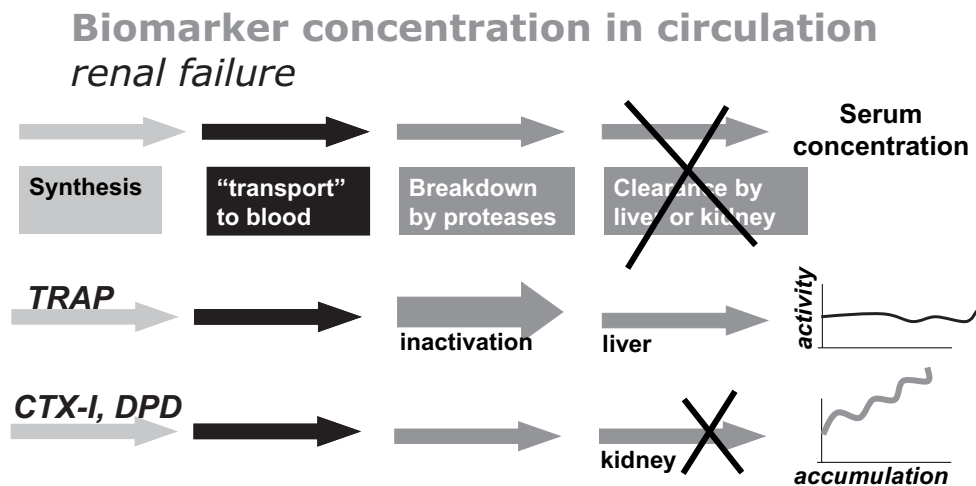


Abb. 14

Dieses Phänomen wurde durch Woitge et al. [11] überzeugend nachgewiesen (Abb. 15). Die durchschnittliche TRAP5b-Aktivität stieg in Patienten mit Leberversagen (HF) und Nierenversagen (RF) nicht an, während sich die durchschnittliche NTX-Konzentration signifikant erhöhte und oberhalb des Normalbereiches bei 51 % der HF- und 93 % der RF-Probanden lag. Das Gesamt-TRAP (5a, 5b und Fragmente) war ebenfalls signifikant erhöht. Dies zeigt eindeutig, dass Leber- oder Nierenversagen keine Auswirkung auf zirkulierendes enzymatisch aktives TRAP5b haben.

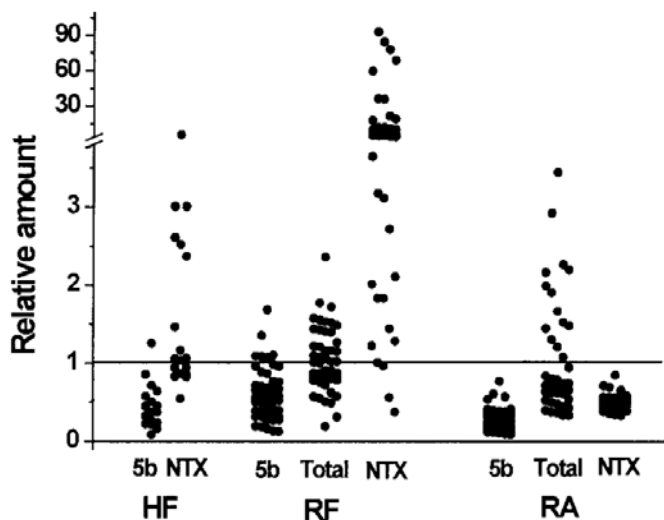


Abb. 15

### 3.3.1 Hämodialyse-Patienten

In der Studie von Shidara et al. [12] wurde gezeigt, dass die Quidel® TRAP5b-Assay-Konzentrationen durch die Dialyse nicht beeinflusst werden. Im Gegensatz dazu verringerte sich Serum-NTX und Osteocalcin signifikant nach den Hämodialysebehandlungen (deutet auf Akkumulation in Serum hin), BAP erhöhte sich signifikant (Abb. 16). Darüber hinaus wurde in derselben Studie nachgewiesen, dass Patienten im höchsten TRAP5b-Tertil die schnellste Rate des kortikalen Knochenverlustes aufwiesen. Positive (PPV) und negative (NPV) Vorhersagewerte, welche die Wahrscheinlichkeit beschreiben, dass ein exzessiver Knochenverlust auftritt bzw. nicht auftritt, waren bei TRAP5b besser als bei Osteocalcin, NTX, BAP und intaktem PTH. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass TRAP5b ein wichtigerer Indikator für die Abschätzung der Knochenresorption bei HD-Patienten ist als NTX.

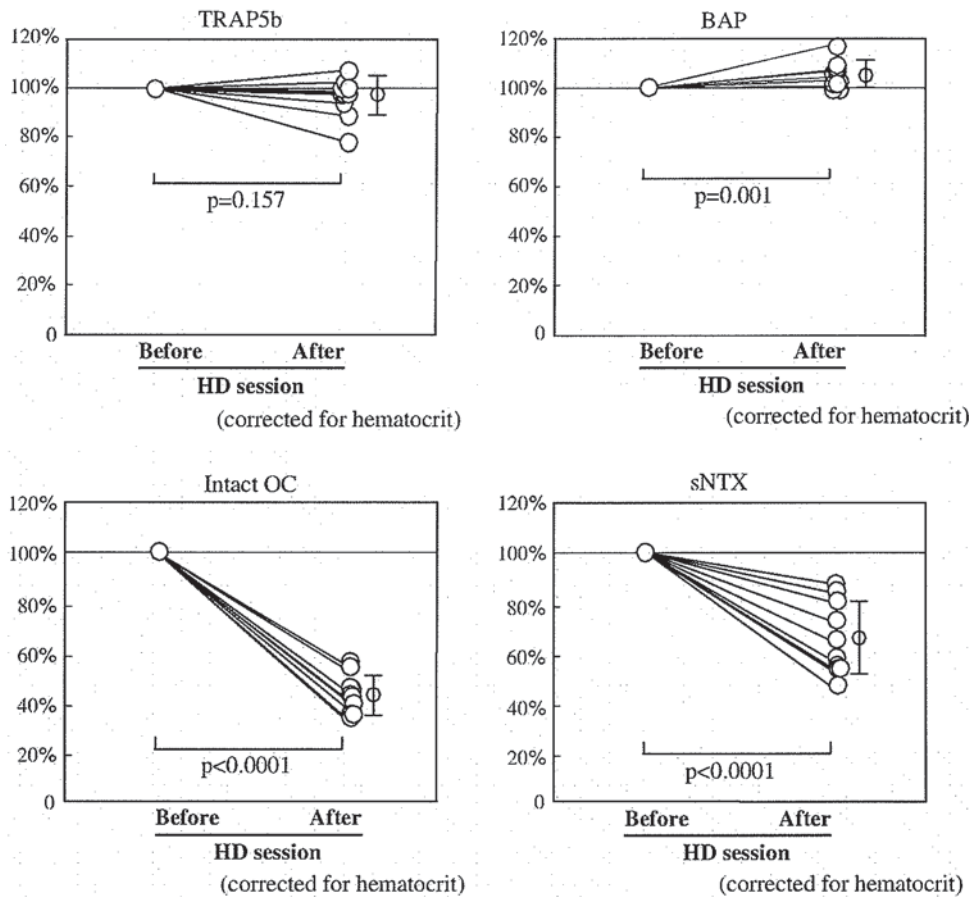


Abb. 16

### 3.3.2 Prä dialyse-Patienten mit chronischer Nierenerkrankung (CKD)

Yamada et al. [13] untersuchten den Nutzen von TRAP5b bei Prä dialyse-Patienten mit chronischer Nierenerkrankung (CKD); ein Vergleich mit den Markern NTX, BAP, Osteocalcin und intaktem PTH wurde vorgenommen. Serum-TRAP5b-Werte von 98 Prä dialyse-CKD-Patienten und 30 HD-Patienten wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Patientengruppen auf. Allerdings waren die Werte in beiden Gruppen signifikant höher als bei 120 gesunden Probanden mit Werten im Normalbereich (Abb. 17). Sie kamen zu dem Schluss, dass Quidel® TRAP5b im Vergleich zu NTX ein besserer Knochenresorptionsmarker für Prä dialyse-CKD-Patienten ist und dass es ein klinisch relevanter Assay für die Knochenresorption ohne Störung durch eine Nierendysfunktion ist. Die Bewertung des Knochenstoffwechsels bei diesen Patienten unter Verwendung von Osteocalcin und NTX kann in der Tat zu einer Überschätzung des Knochenumsatzes führen.

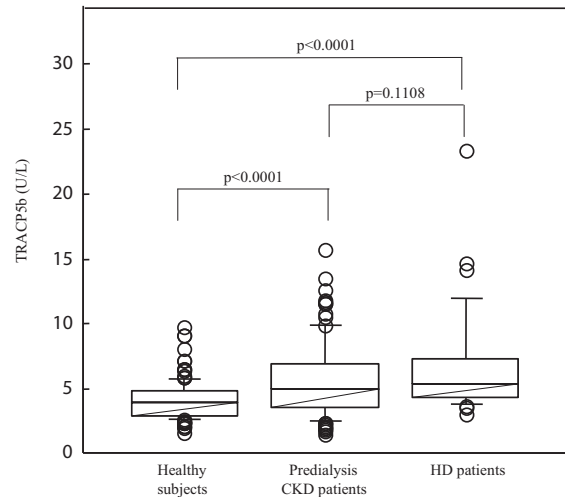


Abb. 17

### 3.3.3 Kinder mit chronischer Nierenerkrankung (CKD)

Price et al. [14] untersuchten die Konzentration von TRAP5b während der Wachstumsphasen bei gesunden Kindern und Kindern mit CKD. Kinder mit CKD hatten erhöhte Konzentrationen von TRAP5b in der präpubertären Phase. In der frühen Adoleszenz wiesen gesunde Kinder eine Erhöhung an TRAP5b auf, gefolgt von einer Abnahme in der Spätphase ihrer Adoleszenz. Im Gegensatz dazu wiesen Kinder mit CKD eine Abnahme von TRAP5b in der frühen Adoleszenz auf, aber die Werte nahmen in der späten Adoleszenz nicht ab (Abb. 18). Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass während einer Periode des erwarteten Knochenmodellierung die TRAP5b-Werte abnahmen; dies ist im Einklang mit dem verringerten linearen Wachstum bei adoleszenten CKD. TRAP5b gilt als wichtiger Marker zum Nachweis von Anomalitäten im Knochenmodellierung bei CKD-Kindern.

#### Spätphase Adoleszenz

\* p < 0.001

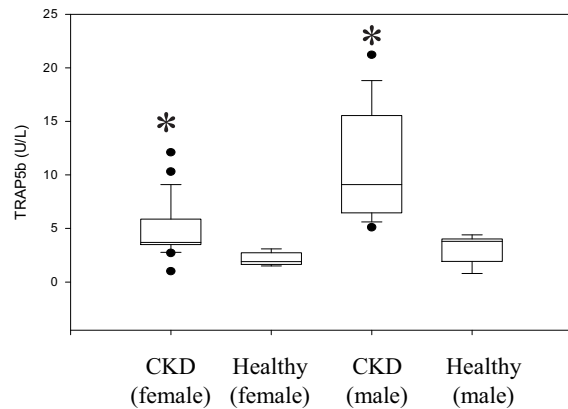


Abb. 18

<b>Präpubertär</b>	Weiblich	1 – 9 Jahre	8.1 ± 3.8 U/l
	Männlich	1 – 10 Jahre	6.6 ± 3.6 U/l
<b>Frühphase Adoleszenz</b>	Weiblich	10 – 13 Jahre	10.0 ± 2.7 U/l
	Männlich	11 – 13 Jahre	9.9 ± 3.3 U/l
<b>Spätphase Adoleszenz</b>	Weiblich	14 – 17 Jahre	2.3 ± 0.7 U/l
	Männlich	14 – 17 Jahre	3.4 ± 1.4 U/l

### 3.4 TRAP5b als Knochen-Resorptionsmarker bei Krebspatienten

Mehrere Studien belegen den Nutzen von TRAP5b als Marker zur Beurteilung der Knochenresorption bei Krebspatienten. TRAP5b ist bei Brustkrebs- [16, Lein] und Prostatakrebs-Knochenmetastasen [17] sowie bei Patienten mit multiplem Myelom [17, Terpos] erhöht.

#### 3.4.1 TRAP5b bei Mammakarzinom-Patienten

Halleen et al. [15] belegen eindeutig die Bedeutung von TRAP5b für Mammakarzinom-Patienten, bei denen Knochenmetastasen (BC+; Abb. 19) detektiert wurden. Die klinische Empfindlichkeit von TRAP5b war wesentlich höher als bei den anderen Knochenresorptions-Markern CTX und NTX. Die wesentlich niedrigere klinische Empfindlichkeit von CTX und NTX im Vergleich zu TRAP5b deutet darauf hin, dass die erhöhte Knochenresorption bei BC+-Patienten primär durch Matrix-Metalloproteinasen vermittelt wird und nicht über den Cathepsin-K-Weg, der zu NTX- und CTX-Metaboliten führt.

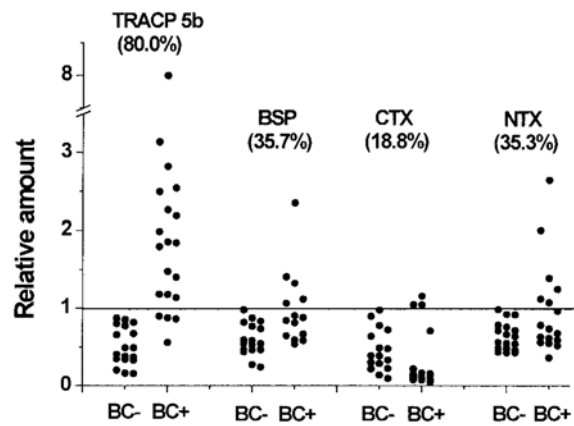


Abb. 19

### 3.5 Krankheitsbilder mit Entkoppelung von Knochenresorption und Anzahl der Osteoklasten

Patienten mit Albers-Schonberg-Krankheit (ADO2; wirkungslose osteoklastische Knochenresorption, die auf dominante Mutationen im C1CN7-Gen zurückzuführen ist) besitzen eine stark erhöhte Anzahl von großen nicht-funktionalen Osteoklasten. Serum-TRAP5b ist stark erhöht, zeigt jedoch offensichtlich keine erhöhte Knochenresorption [18, Alatalo]. Hohe Konzentrationen an TRAP5b können tatsächlich helfen ADO2 zu diagnostizieren, dadurch dass sie auf den hohen Anstieg der Osteoklasten-Anzahl hinweisen.

Pycno ist eine autosomal rezessive osteosklerotische skelettale Dysplasie, die durch einen Mangel an Cathepsin K verursacht wird. Pycno-Patienten bauen kein Typ-I-Kollagen ab; TRAP5b-Konzentrationen sind bei diesen Patienten normal, was auf normale Osteoklastenzahlen hindeutet [19, Nishi]. Die NTX- und CTX-Konzentrationen sind vermindert, was auf eine verringerte Knochenresorption schließen lässt.

## 4. Technische Zusammenfassung des Quidel® TRAP5b-Assays

### TRAP5b, Human (Quidel®)

#### Tartrat-resistente saure Phosphatase

Die Enzymaktivität wird gemessen

CE

Kat. Nr.:	8036	
Tests:	96	
Methode:	ELISA	
Bereich:	2,5–15,5 U/L	
Empfindlichkeit:	0,2 U/L	
Inkubationszeit:	2 Stunden	
Probenmenge:	50 µl	
Probentyp:	Serum, Plasma (Heparin), Zellkultur	
Probenvorbereitung:	Vollblut und Serum können 8 Stunden bei Raumtemperatur, Serum und Plasma 2 Tage bei 2–8 °C gelagert werden. Für einen Monat bei -20 °C, und für einen längeren Zeitraum bei -80 °C.	
Referenzwerte:	Postmenopausale Frauen	Mittelwert 2,89 U/L – SD 0,94
	Prämenopausale Frauen	Mittelwert 1,33 U/L – SD 0,73
	Männer	Mittelwert 1,91 U/L – SD 0,57
Spezies:	Human, (Rhesus Affe)	

### Quidel® TRAP5b, Ratte

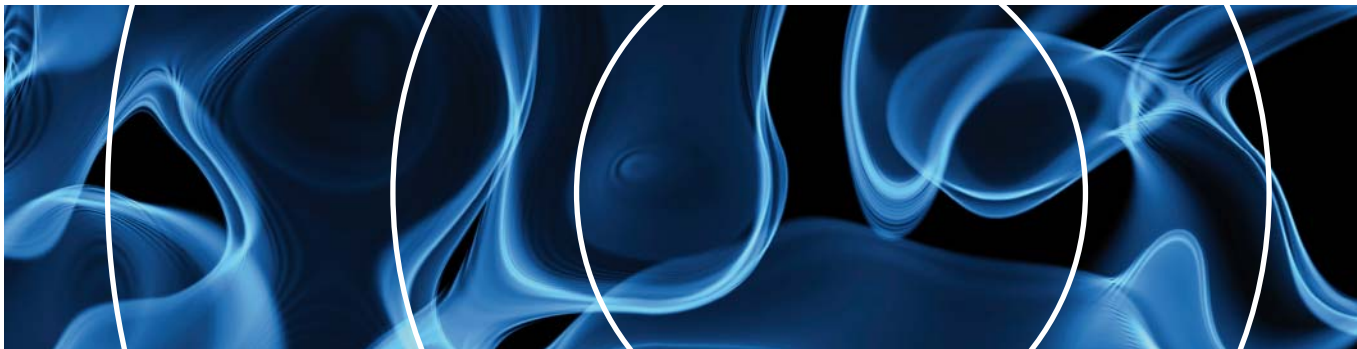
#### Tartrat-resistente saure Phosphatase

Enzymaktivität wird gemessen

Kat. Nr.:	711701	96 Tests	
Methode:	ELISA		
Bereich:	0,4 – 30 U/L		
Sensitivität:	0.4 U/L		
Inkubationszeit:	2 Stunden		
Probenmenge:	20 µl		
Probentyp:	Serum		
Probenvorbereitung:	Serum kann 6 Stunden bei Raumtemperatur und 2 Tage bei 2-8 °C gelagert werden. Für einen Monat bei -20 °C, und für einen längeren Zeitraum bei -80 °C. Maximal 3 Einfrier- und Auftauzyklen.		
Referenzwerte:	Weibliche Wister Ratte	8 Wochen	19.47 U/L (Durchschnitt)
		14 Wochen	15.40 U/L Durchschnitt)
Spezies:	Ratte		
Kreuzreaktion:	TRAP5b	100 %	
	TRAP5a	< 10 %	
	Platelet TRAP	0 %	
	Erythrocyte TRAP	0 %	

## 5. Literaturreferenzen

- [1] Ohashi T, Igarashi Y, Mochizuki Y, Miura T, Inaba N, Katayama K, Tomonaga T, Nomura F. Development of a novel fragments absorbed immunocapture enzyme assay system for tartrate-resistant acid phosphatase 5b. *Clin Chim Acta*. 2007 Feb;376(1-2):205-12
- [2] Data provided by Nitto Boseki Co. Ltd. 2008.
- [3] Hannon RA, Clowes JA, Eagleton AC, Al Hadari A, Eastell R, Blumsohn A. Clinical performance of immunoreactive tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b as a marker of bone resorption. *Bone*. 2004 Jan;34(1):187-94.
- [4] Mochizuki Y et al. Poster presentation for annual meeting of Japan Society of Obstetrics and Gynecology (April 2007, Kyoto).
- [5] Keso CK, Hesser DW and Oliver LK. A comparative evaluation of the BoneTrap<sup>®</sup> and Quidel TRAP5b enzyme immunoassays. Poster presentation at AACC (2008).
- [6] Vergnaud P, Lhoste Y, and Garnero P. A new specific immunoassay for intact serum TRACP5b demonstrates increased sensitivity in osteoporosis. Poster presented at ASBMR (2007).
- [7] Data were kindly obtained from Demary, PhD, Rheumatology Praxis, Hildesheim, Germany, 2008.
- [8] Nenonen A, Cheng S, Ivaska KK, Alatalo SL, Lehtimäki T, Schmidt-Gayk H, Uusi-Rasi K, Heinonen A, Kannus P, Sievänen H, Vuori I, Väänänen HK, Halleen JM. Serum TRACP 5b is a useful marker for monitoring alendronate treatment: comparison with other markers of bone turnover. *J Bone Miner Res*. 2005 Oct;20(10):1804-12
- [9] Naka H, Masaki H, Imanishi Y, Miki T and Nishizawa Y. Therapeutic effect of risedronate for two years on bone metabolic markers. Especially on TRACP-5b. Poster presented at ASBMR (2007).
- [10] Mochizuki Y, Oishi A, Igarashi Y and Inaba N. Comparison of Serum Tartrate-resistant Acid Phosphatase Type 5b Assays and other bone resorption markers for monitoring Raloxifene therapy. Poster presented at ASBMR (2007).
- [11] Woitge HW, Pecherstorfer M, Li Y, Keck AV, Horn E, Ziegler R, Seibel MJ. Novel serum markers of bone resorption: clinical assessment and comparison with established urinary indices. *J Bone Miner Res*. 1999 May;14(5):792-801.
- [12] Shidara K, Inaba M, Okuno S, Yamada S, Kumeda Y, Imanishi Y, Yamakawa T, Ishimura E, Nishizawa Y. Serum levels of TRAP5b, a new bone resorption marker unaffected by renal dysfunction, as a useful marker of cortical bone loss in hemodialysis patients. *Calcif Tissue Int*. 2008 Apr;82(4):278-87. Epub 2008 Apr 18.
- [13] Yamada S, Inaba M, Kurajoh M, Shidara K, Imanishi Y, Ishimura E, Nishizawa Y. Utility of serum tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP5b) as a bone resorption marker in patients with chronic kidney disease: independence from renal dysfunction. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008 Aug;69(2):189-96. Epub 2008 Jan 23.
- [14] Price HE, Langman CB and Brooks ER. TRAP5b profiles in children with chronic kidney disease. Poster presented at ASBMR (2007).
- [15] Halleen JM, Alatalo SL, Janckila AJ, Woitge HW, Seibel MJ, Väänänen HK. Serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b is a specific and sensitive marker of bone resorption. *Clin Chem*. 2001 Mar;47(3):597-600.
- [16] Lein M, Jung K, Schnorr D, Loening SA. Osteoprotegerin and Isoform 5b der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase (TRAP) in Serum als neue Marker für die Knochenmetastierung beim Prostatakarzinom. *Anticancer Reserach* 22 (1B): 510.
- [17] Terpos E, de la Fuente J, Szydlo R, Hatjiharissi E, Viniou N, Meletis J, Yataganas X, Goldman JM, Rahemtulla A. Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b: a novel serum marker for monitoring bone disease in multiple myeloma. *Int J Cancer*. 2003 Sep 1;106(3):455-7.
- [18] Alatalo SL, Ivaska KK, Waguespack SG, Econs MJ, Väänänen HK, Halleen JM. Osteoclast-derived serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b in Albers-Schonberg disease (type II autosomal dominant osteopetrosis). *Clin Chem*. 2004 May;50(5):883-9.
- [19] Nishi Y, Atley L, Eyre DE, Edelson JG, Superti-Furga A, Yasuda T, Desnick RJ, Gelb BD. Determination of bone markers in pycnodysostosis: effects of cathepsin K deficiency on bone matrix degradation. *J Bone Miner Res*. 1999 Nov;14(11).
- [20] Igarashi Y, Lee MY, Matsuzaki S. Acid phosphatases as markers of bone metabolism. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2002 Dec 5;781(1-2):345-58.
- [21] Nishizawa Y, Inaba M, Ishii M, Yamashita H, Miki T, Goto H, Yamada S, Chaki O, Kurawata K, Mochizuki Y. Reference Intervals of serum tartrate-resistant acid phosphatase type 5b activity measured with a novel assay in Japanese subjects.



## The Specialist for Biochemical Markers

For further information please contact: / Für weitere Informationen wenden Sie sich bitte an: / Pour plus d'informations, vous pouvez contacter:

### Exclusive Strategic Partnership in Europe:



**TECOmedical Group**  
Headquarters  
**Switzerland/International**

**TECOmedical AG**  
Gewerbstrasse 10  
4450 Sissach  
Switzerland  
phone +41 (0)61 985 81 00  
fax +41 (0)61 985 81 09  
mail [info@tecomedical.com](mailto:info@tecomedical.com)  
web [www.tecomedical.com](http://www.tecomedical.com)



### Germany

**TECOmedical GmbH**

Wasserbreite  
32257 Bünde  
Germany

phone +49 (0)52 23 985 99 99  
fax +49 (0)52 23 985 99 98  
mail [info@tecomedical.com](mailto:info@tecomedical.com)  
web [www.tecomedical.com](http://www.tecomedical.com)

### France

**TECOmedical SARL**

20 rue du Bois Chaland  
91090 Lisses  
France

phone 0800 100 437  
fax 0800 100 480  
mail [chdu@tecomedical.com](mailto:chdu@tecomedical.com)  
web [www.tecomedical.com](http://www.tecomedical.com)

### Benelux

**TECOmedical NL**

't Hazeveld 34  
3862 XB Nijkerk  
The Netherlands

phone +31 (0)33 4951 473  
fax +31 (0)33 4951 635  
mail [sbk@tecomedical.com](mailto:sbk@tecomedical.com)  
web [www.tecomedical.com](http://www.tecomedical.com)