

RIDA® QUICK Calprotectin

REF GN3037



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstrasse 17, 64297 Darmstadt, Tyskland

+49 (0) 61 51 81 02-0 / +49 (0) 61 51 81 02-20 / www.r-biopharm.com



1. Avsedd användning

För *in vitro*-diagnostisk användning. Testet RIDA®QUICK Calprotectin är ett manuellt immunokromatografiskt lateralt flödestest för kvantitativ detektering av calprotectin i mänskliga avföringsprover.

Testet RIDA®QUICK Calprotectin hjälper till vid diagnostisering av patienter med misstänkt inflammatorisk tarmsjukdom (IBD), särskilt Crohns sjukdom (CD) och ulcerös kolit (UC), samt tillsammans med andra kliniska biomarkörer för att skilja mellan IBD och irritable tarm (IBS). Testresultaten bör inte användas som enda grund för diagnos.

Produkten är avsedd för yrkesmässig användning.

2. Sammanfattning och förklaring av testet

Calprotectin, även känt som MRP8/14 eller S100A8/A9, är ett kalcium- och zinkbindande protein i proteinfamiljen S100⁽⁸⁾. Det bildar ett heterokomplex med en molekylmassa på 36 kDA från två tunga kedjor (L1H) och en lätt kedja (L1L). Calprotectin utgör 60 % av neutrofila granulocyter, men finns också i en lägre koncentration i monocyter och makrofager. Det är därför involverat i många fysiologiska processer, såsom celdifferentiering, immunreglering, karcinogenes, apoptos och inflammation.

Calprotectin spelar en betydande roll vid inflammation. Det inducerar uttrycket av cellreceptorer som är involverade i migration, adhesion och fagocytos av neutrofiler. Det främjar också kemotaxis och, som ett skadeassocierat molekyllärt mönsterprotein (DAMP), är involverat i den medfödda immunsvaret. Calprotectin är extremt stabilt både *in vivo* och *in vitro* mot nedbrytning av bukspottkörtelsekret, proteaser och bakterier⁽⁴⁾.

Återkommande buksmärta, diarré eller förstoppning kan vara symtom på ett antal olika sjukdomar, såsom kronisk inflammatorisk tarmsjukdom - särskilt Crohns sjukdom (CD) och ulcerös kolit (UC) - och irritable tarm (IBS)⁽⁷⁾.

Eftersom symtomen på irritable tarm (IBS) är mycket lika de av IBD, är mestadels en koloskopi det enda sättet att få en diagnos⁽⁹⁾.

På grund av den homogena fördelningen och stabiliteten av calprotectin i ett avföringsprov är ett avföringsprov lämpligt som en specifik laboratorieparameter för att upptäcka tarminflammation⁽⁴⁾. Många studier har visat att proteinet är väl korrelerat med tarminflammation^(3, 5, 10, 2). Det visades att calprotectinkoncentrationen i avföringen är direkt relaterad till graden av inflammation i tarmslemhinnan och att spårning av koncentrationen i CD och CU kan bidra till att skilja mellan aktiva och vilande sjukdomsfaser⁽⁵⁾.

Mätning av fekalt calprotectin kan därför användas som ett hjälpmedel för att övervaka patienter med IBD samt identifiera ett återfall ^(1, 10, 4). Dessutom kan värdet för fekalt calprotectin diagnostiskt skilja patienter med irritable tarm (IBS) från de med IBD ^(9, 3, 1, 4).

Eftersom bestämningen av fekalt calprotectin är enkel och icke-invasiv, kan det användas som ett viktigt hjälpmedel för att identifiera IBD-patienter ⁽¹⁾.

Koncentrationen av fekalt calprotectin är ett mått på den inflammatoriska aktiviteten i tarmslemhinnan och kan därför vara till hjälp vid övervakning och prognos av återfall hos IBD-patienter.

Testresultaten bör inte användas som enda grund för diagnos.

Calprotectin kan inte specifikt lokalisera inflammation eller skilja mellan inflammation och cancer ^(1,6).

3. Testprincip

Testet RIDA[®]QUICK Calprotectin är ett immunokromatografiskt test. Monoklonala och polyklonala antikroppar mot calprotectin bildar antikropps-antigenkomplex.

Markerade kolloidala guldpartiklar används för att göra det synligt. Mätningen som genereras på detta sätt mäts med hjälp av RIDA[®]QUICK SCAN II (ZRQS2-KD) och omvandlas till en ADM-provkoncentration baserat på en metod som lagras i enheten och en standardkurva som kan läsas från streckkoden.

4. Reagenser som ingår

Reagenserna i satsen räcker till 20 bestämningar.

Tabell 1: Reagenser som ingår

Satsens komponenter	Mängd	Beskrivning
Cassette	20 st.	20 testkassetter
Sample diluent Gult lock	50 mL	Provspädningsbuffert, färdig att använda
Tube Vitt lock	2x10 st.	Avförings- och extraktionsrör med färdig extraktionslösning
Control + Rött lock	250 µL	Positiv kontroll, färdig att använda; koncentration 480 - 1 680 mg/kg
Control - Transparent lock	250 µL	Negativ kontroll, färdig att använda; koncentration < 70 mg/kg
Caps Vitt lock	20 styck.	Lock till avföringsrör

5. Förvaringsanvisningar

Följ riktlinjerna för hantering i tabell 2 och förvara satsen direkt efter användning enligt den angivna informationen. När utgångsdatumet har passerat eller den rekommenderade förvaringsperioden för de öppnade reagenserna har förflutit, gäller inte längre kvalitetsgarantin. Mikrobiell kontaminering av reagenserna eller blandning av reagenserna med varandra kan göra reagenserna oanvändbara. Om ytterförpackningen är skadad kan inte testkassetterns användbarhet garanteras.

Tabell 2: Förvaringsförhållanden och information

	Förvaringstemperatur	Maximal förvaringstid	Kompletterande anmärkningar om förvaring
oöppnad	2 - 8 °C	Kan användas fram till angivet utgångsdatum	-
öppnad	2 - 8 °C	2 månader	Förvara inte reagenser i rumstemperatur under någon längre tid. Förvara dem vid 2 - 8 °C så snart som möjligt efter användning 2 - 8 °C

6. Nödvändiga reagenser som inte medföljer

6.1 Reagenser

Kontrollerna för testet RIDA®QUICK Calprotectin finns i satsen; inga andra reagenser krävs.

6.2 Laboratorieutrustning

Följande utrustning krävs för att utföra testet RIDA®QUICK Calprotectin:

Utrustning
Provrör med utspädning av avföringsextrakt
Vortex-mixer
Rullskakare
Mikropipetter för volymer på 5 µL - 200 µL och 1 mL
Centrifug för mikroreaktionskärnen
Stoppur
RIDA®QUICK SCAN II (tillgänglig hos R-Biopharm AG, art. nr. ZRQS2-KD)

7. Varningar och försiktighetsåtgärder för användare

Det här testet får endast utföras av utbildad laboratoriepersonal.

Riktlinjerna för arbete i medicinska laboratorier (god laboratoriesed) måste följas. Följ alltid bruksanvisningen för detta test noggrant. Byt inte ut eller blanda komponenterna i ett satsparti med komponenterna i ett annat parti. Pipettera inte prover eller reagenser med munnen. Undvik kontakt med skadad hud och slemhinnor. Använd personlig skyddsutrustning (lämpliga handskar, labbrock, skyddsglasögon) vid hantering av reagenser och prover, och tvätta händerna efter avslutat test. Patientprover ska behandlas som potentiellt smittsamma. Rök, ät eller drick inte i områden där prover eller testreagenser hanteras.

Avföringens extraktionsrör, kontrollerna och provspädningsbuffertarna innehåller en blandning av 5-klor-2-metyl-2H-isotiazol-3-on och 2-metyl-2H-isotiazolin-3-on, vilka kan utlösa allergiska reaktioner. Undvik kontakt med hud eller slemhinnor.

Farliga material indikeras i enlighet med föreskrifter på märkningen.

Ytterligare information om Safety Data Sheets (SDS), finns under artikelnumret på <https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

Användare är ansvariga för korrekt kassering av alla reagenser och material efter användning. Följ nationella förordningar om kassering.

För användare i Europeiska unionen: Rapportera alla allvarliga biverkningar som är förknippade med produkten till R-Biopharm AG och relevanta myndigheter.

8. Insamling och förvaring av prover

Samla upp avföringsprover i rena standardbehållare. Samla inte upp avföringsproverna i transportbehållare som innehåller transportmedier med konserveringsmedel eller fixeringsvätska, djurserum, metalljoner, oxiderande medel eller rengöringsmedel eftersom sådana ämnen kan störa testet RIDA[®]QUICK Calprotectin.

Följ förvaringsanvisningarna för prover i tabell 3. Avföringsproverna ska levereras till laboratoriet och extraheras 3 dagar efter insamlingen. Temperaturen under transport bör inte överstiga 30 °C; kyltransport rekommenderas.

Tabell 3: Provförvaring

Ursprungligt avföringsprov		Observera
2 - 8 °C	2 dagar	-
-20 °C	1 år	Maximalt 3 frys-upptiningscykler
Extraherat prov i Tube		Observera
20 - 25 °C (rumstemperatur)	3 dagar	-
2 - 8 °C	14 dagar	-
-20 °C	90 dagar	Maximalt 4 frys-upptiningscykler

9. Testprocedur

9.1. Allmän information

Alla reagenser, **Tube** och testkassetter **Cassette** måste anta rumstemperatur (20-25 °C) före användning. När testkassetterna har använts får de inte återanvändas. Utför inte testproceduren i direkt solljus. Återför inte överskottsreagens till flaskorna eftersom kontaminering kan uppstå. RIDA®QUICK SCAN II måste vara påslagen innan testet startas. Vid första användningen av satspartiet måste streckkoden som innehåller testmetoden och den partispecifika parametern skannas in med en streckkodsläsare och lagras sedan på RIDA®QUICK SCAN II för framtida mätningar (se även RIDA®QUICK SCAN II-manualen).

QR-koden finns i det Certificate of Analysis som medföljer satsen.

9.2. Extraktion av avföringsprov

A. Standardprocedur för extrahering av avföring med normal konsistens

Samla upp avföringsprovet i rena standardbehållare. Ta bort staven på avföringsröret genom att vrida skruvlocket moturs. Doppa sedan staven i avföringsprovet och rotera den flera gånger tills alla spår är fyllda med avföringsprov. Ta bort överflöd av avföring genom att rotera staven på standardbehållarens innervägg innan du sätter tillbaka staven i avföringsröret. För sedan in staven helt genom tratten (blå) i röret med extraktionsvätskan och vrid locket medurs tills det är ordentligt stängt.

B. Extraktionsmetod för lös avföring

Denna procedur kräver en mikropipett för att extrahera ett 56 µL prov av lös avföring. Ta bort staven på avföringsröret genom att vrida skruvlocket moturs. Pipettera sedan in den lösa avföringen direkt i avföringsröret med extraktionslösningen. Sätt sedan in staven helt genom tratten (blå) i röret med extraktionsvätskan och vrid locket medurs tills det är ordentligt stängt.

9.3. Extraktionsprocess

Vortexera extraktionsröret för avföring [Tube] som innehåller provet i 30 - 60 sekunder för att homogenisera suspensionen väl. Stavens fördjupningar ska vara synligt fria från avföringsrester, vortexera annars det i ytterligare 30 - 60 sekunder (högst 120 sekunder, oavsett om avföringsresterna syns i fördjupningarna eller inte). Alternativt kan avföringsrören placeras på en rullskakare i 20 minuter efter första vortexeringen. Ta först bort staven med locket (vitt) tillsammans med tratten (blått) genom att vrida den medurs och försegla avföringsröret med ett av de medföljande [Caps]. Centrifugera sedan avföringsprovet i 10 minuter vid 1 000 - 3 000 x g för att avlägsna alla återstående avföringspartiklar från supernatanten. Det förtydligade avföringsprovet kan sedan analyseras.

9.4. Testprocedur

RIDA®QUICK Calprotectin har ett mätområde på 50 - 2 100 mg/kg. Späd provet 1:300 genom att tillsätta 5 µL provextrakt + 1 495 µL provspädningsbuffert [Sample diluent]. Blanda sedan väl. Placera testkassetten [Cassette] urtagen ur förpackningen på en plan yta. Använd sedan pipetten för att tillsätta 100 µL av det utspädda avföringsprovet/100 µL av den positiva eller negativa kontrollen till testremsans appliceringsfält. Läs av testresultaten från RIDA®QUICK SCAN II efter **20 minuter**. Tiden måste hållas exakt. Mätningar som görs före eller efter 20 minuter kan ge ett felaktigt resultat.

10. Kvalitetskontroll - indikation på reagensernas instabilitet eller utgångsdatum

Testet bör endast utvärderas om testkassetten och membranet är intakta före pipettering av provsuspensionen och inga förändringar i färg eller band kan ses. Kontrollbandet (märkt C på testkassetten) måste synas varje gång testet körs.

Om bandet inte syns kontrollerar ni följande innan testet upprepas:

- Utgångsdatum för de reagenser som används
- Funktionaliteten hos de mikropipetter som används (t.ex. kalibrering)
- Korrekt testprocedur
- Visuell inspektion av satskomponenterna avseende kontaminering eller läckage

Om villkoren fortfarande inte är uppfyllda efter upprepning av testet, kontakta tillverkaren eller din lokala R-Biopharm-distributör.

11. Utvärdering och tolkning

Analysen görs med RIDA[®]QUICK SCAN II (se även manualen för RIDA[®]QUICK SCAN II).

Kontrollbandet (märkt C på testkassetten) måste synas varje gång testet körs. Om detta band saknas följ instruktionerna i avsnitt 10.

Beroende på calprotectinkoncentrationen i provet, kan signalbandet (märkt T på testkassetten) synas efter olika tidpunkter och med olika intensitet. Låt körtiden bli totalt 20 minuter. Därefter kan ni göra en slutlig kvantifiering av testresultaten med hjälp av RIDA[®]QUICK SCAN II-läsaren.

Följ alltid den angivna inkubationstiden på 20 minuter så exakt som möjligt.

De specificerade värdena och variationerna återfinns i Certificate of Analysis.

11,1. Testresultat

En intern studie genomfördes för att bestämma brytpunkten för testet RIDA[®]QUICK Calprotectin. Vid ett brytpunktsvärde på > 140 mg/kg mänskligt calprotectin i avföringen måste resultatet betraktas som positivt. Om resultatet är mellan 70 och 140 mg/kg rekommenderas en upprepad extraktion och utvärdering av provet efter 4 till 6 veckor. Prover < 70 mg/kg kan bedömas som negativa.

Vi råder varje laboratorium att upprätta sitt eget standardvärdesintervall.

12. Metodens begränsningar

Ett samband mellan den koncentration av calprotectin som upptäckts och förekomsten av svårighetsgraden av kliniska symtom kan inte härledas från detta. De resultat som uppnås måste alltid tolkas i kombination med alla kliniska symtom.

13. Prestandaegenskaper

13.1 Kliniska prestandaegenskaper

Den kliniska prestandan för testet RIDA[®]QUICK Calprotectin testades i en studie med totalt 81 patientprover. Fyrtiotvå patienter diagnostiserades med Crohns sjukdom, ulcerös kolit eller mikroskopisk kolit. Det positiva resultatet diagnostiserades baserat på kliniska fynd och/eller bekräftades genom koloskopi. De 39 negativa proverna kom från patienter med irritable tarm (IBS), återkommande magsmärtor och andra sjukdomar.

Tabell 4: Klinisk prestanda för testet RIDA[®]QUICK Calprotectin.

Bedömning av prover i detektionsgränsen som positiva				
		RIDA [®] QUICK Calprotectin (brytpunkt = 70 mg/kg)		
		Positivt	Negativt	Totalt
Klinisk diagnos	IBD	42	0	42
	Ej IBD	12	27	39
	Totalt	54	27	81
Känslighet		100 %	95 % CI* (91,6 %-100,0 %)	
Specificitet		69,2 %	95 % CI* (53,6 %-81,4 %)	
PPV**		76,5 %	95 % CI* (67,0 %-83,9 %)	
NPV**		100 %	95 % CI* (100,0 %-100,0 %)	

Bedömning av prover i detektionsgränsen som negativa				
		RIDA®QUICK Calprotectin (brytpunkt = 140 mg/kg)		
		Positivt	Negativt	Totalt
Klinisk diagnos	IBD	40	2	42
	Ej IBD	4	35	39
	Totalt	44	37	81
Känslighet		95,2 %	95 % CI* (84,2 %-98,7 %)	
Specificitet		89,7 %	95 % CI* (76,4 %-95,9 %)	
PPV**		90,9 %	95 % CI* (79,8 %-96,2 %)	
NPV**		94,6 %	95 % CI* (81,8 %-98,5 %)	

*CI = konfidensintervall (Mercaldo-Wald)

**PPV = positivt beräknat värde

***NNV = negativt beräknat värde

13.2 Analytiska prestandaegenskaper

13.2.1 Analytisk sensitivitet (LoB, LoD och LoQ)

Den analytiska känsligheten för testet RIDA®QUICK Calprotectin bestämdes genom att man fann gränsen för blankvärde (LoB), detektionsgränsen (LoD) och kvantifieringsgränsen (LoQ).

Tabell 5: Analytiska känslighetsresultat för testet RIDA®QUICK Calprotectin

	mg/kg
LoB	17,7
LoD	29,4
LoQ	35,0

13.2.2 Analytisk specificitet

Störande ämnen

För testning av störande effekter tillsattes respektive ämne till prover som fördelades över hela mätområdet och vart och ett testades jämfört med "oförorenade" kontrollprover. De potentiellt interfererande ämnena som testades anges i tabell 6.

Tabell 6: Potentiellt störande ämnen

Interfererande ämne	Testad mängd / 50 mg avföring
Hemoglobin	5,83 mg
Vankomycin	0,67 mg
Ciprofloxacin	0,50 mg
Prevacid	0,02 mg
Azatioprin	0,07 mg
Prednison	0,01 mg
5-aminosalicylsyra	1,33 mg
Vitamin A	8 IE
Vitamin D	1,1 IE
Vitamin C	0,05 mg
Vitamin E	0,10 mg
Bariumsulfat	0,25 mg
Loperamid HCl	0,34 µg
Vismutsubsalylat	0,04 mg
Metronidazol	0,63 mg
Mucin	0,17 mg
Aluminiumhydroxid + magnesiumhydroxid	0,21 mg

Palmitinsyra	0,07 mg
Stearinsyra	0,13 mg
Polyetylenglykol 3350	3,95 mg
Omeprazol	0,03 mg
S100A12 Protein	1,05 µg
Simetikon	0,03 mg
Cimetidin	0,03 mg
Kalciumkarbonat	0,03 mg

Alla testade ämnen betraktas som icke-kritiska eftersom de inte orsakar några betydande effekter på testresultatet om de förekommer i de angivna koncentrationerna i avföringsproverna.

13.2.3 Noggrannhet

Precision

Precisionsdata samlades in med 6 kontrollprover (4 positiva prover, 1 prov i gränsintervallet och 1 negativt prov). Varje prov analyserades i tre exemplar i två omgångar per dag under 20 dagar. För inter-partitestet extraherades och testades 6 olika avföringsprover (4 positiva prover, 1 prov i gränsintervallet och 1 negativt prov) i en 5-faldig bestämning per körning/dag under 5 dagar med 3 olika partier. De fastställda CV % -värdena måste vara lika med eller mindre än 20 %. Resultaten visas i följande tabell.

Tabell 7: Precisionsresultat för testet RIDA®QUICK Calprotectin

ID #	N	Medelvärde (mg/kg)	Inom en körning		Mellan körningar		Mellan dagar		Totalt	
			SV (mg/kg)	CV	SV (mg/kg)	CV	SV (mg/kg)	CV	SV (mg/kg)	CV
1	120	56,0	6,9	12,4 %	3,1	5,5 %	2,9	5,1 %	7,6	13,6 %
2	120	75,9	10,5	13,8 %	2,9	3,8 %	3,0	3,9 %	10,8	14,3 %
3	120	238,0	29,5	12,4 %	7,2	3,0 %	9,4	4,0 %	30,4	12,8 %
4	120	446,6	58,9	13,2 %	12,8	2,9 %	19,3	4,3 %	60,4	13,5 %
5	120	783,5	87,8	11,2 %	14,8	1,9 %	20,4	2,6 %	89,2	11,4 %
6	120	1559,2	300,0	19,2 %	0,0	0,0 %	28,9	1,9 %	290,9	18,7 %

Tabell 8: Prestandaresultat för testet RIDA®QUICK Calprotectin

ID #	N	Medelvärde (mg/kg)	Repeterbarhet		Inom ett parti		Mellan partier		Totalt	
			SV (mg/kg)	CV	SV (mg/kg)	CV	SV (mg/kg)	CV	SV (mg/kg)	CV
1	75	54,4	6,2	11,4 %	7,1	13,1 %	5,9	10,9 %	9,2	17,0 %
2	75	66,4	8,3	12,6 %	9,0	13,6 %	7,6	11,4 %	11,7	17,7 %
3	75	277,6	34,3	12,4 %	39,0	14,1 %	0,0	0,0 %	39,0	14,1 %
4	75	409,8	44,8	10,9 %	52,4	12,8 %	16,1	3,9 %	54,8	13,4 %
5	75	764,7	109,6	14,3 %	127,5	16,7 %	0,0	0,0 %	127,5	16,7 %
6	75	1326,3	182,6	13,8 %	184,7	13,9 %	41,1	3,1 %	189,2	14,3 %

13.2.4 Linjäritet










Testet av linjäritetsstudien sådde acceptabla resultat för linjäritet samt precisionen hos testet RIDA®QUICK Calprotectin för Calprotectinkoncentrationer i intervallet 40 mg/kg - 2 100 mg/kg.

14. Versionshistorik

Versionsnummer	Avsnitt och benämning
2022-04-25	Ursprunglig version

15. Symbolförklaringar

Allmänna symboler

	För in vitro-diagnostisk användning
	Följ bruksanvisningen
	Batchnummer
	Använd före
	Förvaringstemperatur
	Artikelnummer
	Antal tester
	Tillverkare
	Endast för engångsbruk

Testspecifika symboler

Cassette	Testkassett
Sample Diluent	Provspädningsbuffert
Tube	Avförings- och extraktionsrör
Caps	Lock
Control +	Positive control
Control -	Negative control

16. Referenser

1. Chang MH, Chou JW, Chen SM, Tsai MC, Sun YS, Lin CC, Lin CP. Faecal calprotectin as a novel biomarker for differentiating between inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome. *Mol Med Rep.* 2014 Jul;10(1):522-6.
2. D'Haens G, Ferrante M, Vermeire S, Baert F, Noman M, Moortgat L, Geens P, Iwens D, Aerden I, Van Assche G, Van Olmen G, Rutgeerts P. Fecal calprotectin is a surrogate marker for endoscopic lesions in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2012 Dec;18(12):2218-24.
3. Gisbert JP, McNicholl AG. Questions and answers on the role of faecal calprotectin as a biological marker in inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis.* 2009 Jan;41(1):56-66
4. Pathirana WGW, Chubb SP, Gillett MJ, Vasikaran SD. Faecal Calprotectin. *Clin Biochem Rev.* 2018 Aug;39(3):77-90.
5. Smith LA, Gaya DR. Utility of faecal calprotectin analysis in adult inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2012 Dec 14;18(46):6782-9.
6. Summerton CB, Longlands MG, Wiener K, Shreeve DR. Faecal calprotectin: a marker of inflammation throughout the intestinal tract. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2002 Aug;14(8):841-5.
7. Walsham NE, Sherwood RA. Fecal calprotectin in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Gastroenterol.* 2016 Jan 28;9:21-9.
8. Wang S, Wang Z, Shi H, Heng L, Juan W, Yuan B, Wu X, Wang F. Faecal calprotectin concentrations in gastrointestinal diseases. *J Int Med Res.* 2013 Aug;41(4):1357-61.
9. Waugh N, Cummins E, Royle P, Kandala NB, Shyangdan D, Arasaradnam R, Clar C, Johnston R. Faecal calprotectin testing for differentiating amongst inflammatory and non-inflammatory bowel diseases: systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess.* 2013 Nov;17(55):xv-xix, 1-211
10. Zhulina Y, Cao Y, Amcoff K, Carlson M, Tysk C, Halfvarson J. The prognostic significance of faecal calprotectin in patients with inactive inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2016 Sep;44(5):495-504.