

April 2019

QIASymphony[®] RGQ Anwendungsblatt

artus[®] VZV QS-RGQ Kit (Probentyp: Plasma)

R2



4502363

artus VZV QS-RGQ Kit, Version 1



Prüfen Sie vor einer Testausführung die Verfügbarkeit neuer elektronischer Etikettierungsrevisionen im Internet unter www.qiagen.com/products/artusvzvpckitce.aspx.

Allgemeine Informationen

Kit	<i>artus</i> VZV QS-RGQ Kit, Version 1 (Kat.-Nr. 4502363)
Validiertes Probenmaterial	EDTA-Humanplasma
Aufreinigung im Vorfeld	QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit (Kat.-Nr. 937055)
Probenvolumen (inkl. Zusatzvolumen)	1200 µl
Assay-Parameter-Set	<i>artus_VZV_plasma1000_V5</i>
Standard-Assay-Kontroll-Set	Cellfree1000_V7_DSP_artus_VZV
Elutionsvolumen	60 µl
Erforderliche Softwareversion	Version 4.0 oder höher
Volumen Master-Mix	30 µl
Volumen Template	20 µl
Anzahl der Reaktionen	6-24
Laufzeit auf AS-Modul	Für 6 Reaktionen: etwa 9 Minuten Für 72 Reaktionen: etwa 35 Minuten

Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien

Aufreinigungs-Kit

- QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit (Kat.-Nr. 937055)

Adapter für QIASymphony SP

- Elution Microtube Rack QS (Cooling Adapter, EMT, v2, Qsym, Kat.-Nr. 9020730)
- Transfer-Rahmen
- Tube Insert 3B (Insert, 2.0ml v2, samplecarr. (24), Qsym, Kat.-Nr. 9242083)

Verbrauchsmaterialien für QIASymphony SP

- Sample Prep Cartridges, 8-well (Kat.-Nr. 997002)
- 8-Rod Covers (Kat.-Nr. 997004)
- Filter-Tips, 1500 µl (Kat.-Nr. 997024)
- Filter-Tips, 200 µl (Kat.-Nr. 990332)
- Elution Microtubes CL (Kat.-Nr. 19588)
- Tip disposal bags (Kat.-Nr. 9013395)
- Micro tubes 2.0 ml Type H oder Micro tubes 2.0 ml Type I (Sarstedt®, Kat.-Nr. 72.693 und 72.694, www.sarstedt.com) zur Verwendung mit Proben und internen Kontrollen

Adapter und Reagenzienhalter für den QIASymphony AS

- Reagent holder 1 QS (Cooling Adapter, Reagent Holder 1, Qsym, Kat.-Nr. 9018090)
- RG Strip Tubes 72 QS (Cooling Adapter, RG Strip Tubes 72, Qsym, Kat.-Nr. 9018092)

Verbrauchsmaterialien für QIASymphony AS

- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (Kat.-Nr. 981103)
- Tubes, conical, 2 ml, Qsym AS (Kat.-Nr. 997102) oder Micro tubes 2.0 ml Type I (Sarstedt, Kat.-Nr. 72.694.005)
- Ersatzweise: Tubes, conical, 5 ml, Qsym AS (Kat.-Nr. 997104) oder Tubes with flat base from PP (Sarstedt, Kat.-Nr. 60.558.001)
- Filter-Tips, 1500 µl (Kat.-Nr. 997024)
- Filter-Tips, 200 µl (Kat.-Nr. 990332)
- Filter-Tips, 50 µl (Kat.-Nr. 997120)
- Tip disposal bags (Kat.-Nr. 9013395)

Lagerung und Handhabung der Untersuchungsproben

Probennahme	Blutprobe 5–10 ml EDTA-Blut 8 mal überkopf mischen – nicht schütteln! Es dürfen keine heparinisierten Humanproben verwendet werden.
Probenlagerung	Trennung: 20 Minuten zentrifugieren bei 800 bis 1.600 x g innerhalb von 24 Stunden nach Probennahme Isoliertes Plasma in ein steriles Polypropylen-Röhrchen überführen Die Sensitivität des Assays kann durch routinemäßiges Einfrieren oder durch eine längere Lagerung der Proben verringert werden.
Probentransport	Bruchsicher transportieren Lieferung innerhalb von 24 Stunden Postversand entsprechend den gesetzlichen Vorgaben für den Transport von pathogenem Material* Blutproben müssen gekühlt verschickt werden (2 bis 8 °C)
Störsubstanzen	Heparin (≥ 10 IU/ml) beeinträchtigt die PCR. Proben in Röhrchen mit Heparin als Antikoagulans oder Proben von heparinisierten Patienten dürfen nicht verwendet werden.
Probenvorbereitung	Vermeiden Sie Schaumbildung in und auf den Proben Die Proben müssen vor Start des Protokolllaufs auf Raumtemperatur (15–25 °C) äquilibriert werden.

* International Air Transport Association (IATA).
Dangerous Goods Regulations (Regelungen zum Transport gefährlicher Güter).

Verfahren

Vorbereitung der Carrier-RNA und Zugabe der internen Kontrolle zu den Proben

Bei der Verwendung des QIASymphony DSP Virus/Pathogen Mini Kits zusammen mit dem *artus* VZV QS-RGQ Kit muss die interne Kontrolle (VZV IC) im Aufreinigungsverfahren mitgeführt werden, um die Überwachung der Effizienz der Probenvorbereitung und des folgenden Assays zu ermöglichen.

Interne Kontrollen müssen zusammen mit dem (CARRIER-)RNA-Buffer AVE (AVE)-Gemisch zugegeben werden, wobei das Gesamtvolumen des Gemischs aus interner Kontrolle und (CARRIER-)RNA-Buffer AVE (AVE)-Gemisch ebenfalls 120 µl beträgt.

Die Tabelle gibt die Zugabe von interner Kontrolle zu der Isolation in einem Verhältnis von 0,1 µl pro 1 µl Elutionsvolumen wieder. Wir empfehlen, unmittelbar vor jedem Lauf frische Mischungen herzustellen.

Alternativ kann das „IC Calculator“-Tool (Tool zur Berechnung der internen Kontrolle) der QIASymphony Management Console verwendet werden.

Komponente	Volumen (µl) (Sarstedt-Röhrchen)*	Volumen (µl) (Corning-Röhrchen)†
Carrier-RNA-Vorratslösung (CARRIER)	5	5
Interne Kontrolle‡	9	9
Buffer AVE	106	106
Endvolumen pro Probe (ohne Totvolumen)	120	120
Gesamtvolumen für n Proben	$(n \times 120) + 360^{\S}$	$(n \times 120) + 600^{\P}$

* Micro tubes 2.0 ml Type H und Micro tubes 2.0 ml Type I, Sarstedt Kat.-Nr. 72.693 und 72.694.

† Tubes 14 ml, 17 x 100 mm polystyrene round-bottom (Corning® Inc., Kat.-Nr. 352051; dieses Röhrchen wurde früher von Becton Dickinson und wird jetzt von Corning Inc. angeboten).

‡ Die Berechnung der Menge der internen Kontrolle basiert auf dem ursprünglichen Elutionsvolumen (90 µl). Das zusätzliche Totvolumen hängt von der Art des verwendeten Probenröhrchens ab.

§ Interne Kontrollmischung ausreichend für 3 zusätzliche Proben (d. h. 360 µl) ist erforderlich. Füllen Sie nicht mehr als 1,92 ml Gesamtvolumen ein (entsprechend von maximal 13 Proben. Diese Volumen sind spezifisch für Micro tubes 2.0 ml Type H und Micro tubes 2.0 ml Type I, Sarstedt Kat.-Nr. 72,693 und 72,694).

¶ Interne Kontrollmischung ausreichend für 5 zusätzliche Proben (d. h. 600 µl) ist erforderlich. Füllen Sie nicht mehr als 13,92 ml Gesamtvolumen ein (entsprechend von maximal 111 Proben. Diese Volumen sind spezifisch für Tubes 14 ml, 17 x 100 mm polystyrene round-bottom (Corning Inc., Kat.-Nr. 352051; dieses Röhrchen wurde früher von Becton Dickinson und wird jetzt von Corning Inc. angeboten).

Konfiguration des QIASymphony SP

Schublade „Waste“ (Abfall)

Einheitsboxhalter 1–4	Leercontainer für Verbrauchsmaterial
Halter für Abfallbeutel	Abfallbeutel
Halter für Flüssigabfallbehälter	Flüssigabfallbehälter leeren und einsetzen

Schublade „Eluate“ (Eluat)

Elutions-Rack	Elution Microtubes CL in Elution Microtube Rack QS und Transfer Frame Stellplatz 1, Kühlposition, verwenden
Elutionsvolumen*	Vorausgewähltes Elutionsvolumen: 60 µl Anfängliches Elutionsvolumen: 90 µl

* Das Elutionsvolumen für das Protokoll ist vorausgewählt. Es handelt sich um das mindestens verfügbare Eluatvolumen im abschließenden Elutionsgefäß. Das anfängliche Volumen der Elutionslösung ist erforderlich, um sicherzustellen, dass das tatsächlich erhaltene Eluatvolumen dem vorausgewählten Volumen entspricht.

Schublade „Reagents and Consumables“ (Reagenzien und Verbrauchsmaterialien)

RC Position 1 und 2	Setzen Sie bei Verarbeitung von bis zu 48 Proben eine bzw. bei Verarbeitung von bis zu 96 Proben zwei Reagenzienkartuschen (Reagent Cartridge, RC) ein.
Tip-Rack-Halter, Positionen 1-18	Laden Sie ausreichend Racks mit Einmal-Filterspitzen, 200 µl und 1500 µl (siehe „Erforderliches Plastikzubehör für 1 bis 4 Probenchargen“ auf Seite 7)
Halter für Einheitsboxen, Positionen 1-4	Laden Sie Verbrauchsartikel-Container mit Probenvorbereitungskartuschen und 8-Rod Covers (siehe „Erforderliches Plastikzubehör für 1 bis 4 Probenchargen“ auf Seite 7)

Schublade „Sample“ (Probe)

Probentyp	EDTA-Humanplasma
Probenvolumen (inkl. Zusatzvolumen)	1200 µl
Probenröhrchen	Micro tubes 2.0 ml Type H oder Micro tubes 2.0 ml Type I (Sarstedt, Kat.-Nr. 72.693 und 72.694)
Einsatz	Tube Insert 3B (Kat.-Nr. 9242083)

Erforderliches Plastikzubehör für 1 bis 4 Probenchargen

Komponente	Eine Charge, 24 Proben*	Zwei Chargen, 48 Proben*	Drei Chargen, 72 Proben*	Vier Chargen, 96 Proben*
Disposable filter-tips, 200 µl†‡	28	52	76	100
Disposable filter-tips, 1500 µl†‡	113	206	309	402
Sample Prep Cartridges§	21	42	54	72
8-Rod Covers¶	3	6	9	12

* Bei mehr als einem Röhrchen mit internen Kontrollen pro Charge und mehr als einem Inventar-Scan sind zusätzliche Einmal-Filterspitzen erforderlich.

† Jedes Spitzenrack enthält 32 Filterspitzen.

‡ Bei der Anzahl der erforderlichen Filterspitzen sind die für 1 Inventar-Scan pro Reagenzienkartusche benötigten Filterspitzen eingerechnet.

§ Ein Verbrauchsartikel-Container enthält 28 Probenvorbereitungskartuschen.

¶ Ein Verbrauchsartikel-Container enthält zwölf 8-Rod Covers.

Konfiguration des QIASymphony AS

Verbrauchsmaterial

Beim Einrichten werden die passenden Positionen für jeden Verbrauchsartikel auf dem QIASymphony AS Modul auf dem Touchscreen des Geräts angezeigt.

Verbrauchsmaterial	Name auf Touchscreen	Verwendung mit Adapter/ Reagenzienhalter
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	QIA#981103 *StripTubes 0.1	RG Strip Tubes 72 QS
Tubes, conical, 2 ml, Qsym AS (500) ^{†‡}	QIA#997102 *T2.0 ScrewSkirt [§]	Reagent holder 1 QS
Tubes, conical, 5 ml, Qsym AS (500) ^{†‡}	QIA#997104 *T5.0 ScrewSkirt [§]	Reagent holder 1 QS

* Bezeichnet Labormaterial, das mit einem Kühladapter mit Barcode gekühlt werden kann.

[†] Für Komponenten des Master-Mix, vom System angesetzten Master-Mix, Assay-Standards und Assay-Kontrollen.

[‡] **Alternativ können die in „Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien“ auf Seite 3** beschriebenen Röhrchen von Sarstedt verwendet werden.

[§] Der auf dem Touchscreen für das betreffende Röhrchen angezeigte angehängte Buchstabe „(m)“ bedeutet, dass die Berechnungen des Flüssigkeitsstands für Reagenzien, die einen konkaven Meniskus ausbilden, optimiert wurden.

Adapter und Reagenzienhalter

Rack/Reagenzienhalter	Name	Erforderliche Anzahl [¶]
Reagenzienhalter	Reagent holder 1 QS	1
Proben-Racks	RG Strip Tubes 72 QS	1

[¶] Für einen Assay-Lauf mit 72 Reaktionen berechnet.

Filterspitzen

Stellen Sie zunächst Spitzenracks in die Spitzenrack-Stellplätze 1, 2 und 3 der Schublade „Eluate and Reagents“ (Eluate und Reagenzien) und dann die Spitzenracks in die Spitzenrack-Stellplätze 7, 8 und 9 der Schublade „Assays“.

Verbrauchsmaterial	Name auf Touchscreen	Minimale Anzahl für 24 Reaktionen	Minimale Anzahl für 72 Reaktionen
Filter-Tips, 1500 µl (1024)	1500 µl	4	6
Filter-Tips, 200 µl (1024)	200 µl	9	8
Filter-Tips, 50 µl (1024)	50 µl	25	73
Tip Disposal Bags	–	1	1

PCR auf dem Rotor-Gene Q*

Protokolldetails schlagen Sie bitte im Software-spezifischen Protokollblatt „*Settings to run artus QS-RGQ Kits*“ unter www.qiagen.com/products/artusvzvpcrkitce.aspx nach.

Spezifische Einstellungen für den *artus* VZV QS-RGQ Kit

Die spezifischen Einstellungen für die Rotor-Gene® Software ab Version 2.1 werden nachfolgend aufgeführt.

„Reaction Volume“ (Reaktionsvolumen) (µl)	50
„Hold“ (Halten)	„Hold Temperature“ (Haltetemperatur): 95 Grad „Hold Time“ (Haltedauer): 10 Minuten
Cycling (Reaktionszyklen)	45-mal 15 Sekunden lang 95 Grad 30 Sekunden lang 65 Grad („Acquire“ [Datenerfassung] über die Kanäle „Green“ und „Orange“, Touchdown-Funktion für 10 Zyklen aktivieren) 20 Sekunden lang 72 Grad
„Auto-Gain Optimisation Setup“ (Einrichten der automatischen Verstärkungsoptimierung)	65 Grad („Samples“ [Proben]: „Green“; IC: Orange)

Interpretation der Ergebnisse

Dieser Abschnitt beschreibt eine Interpretation der Ergebnisse auf dem Rotor-Gene Q. Prüfen Sie für eine Analyse des gesamten Arbeitsablaufs von der Probe bis zum Ergebnis auch die Probenstatusinformationen aus den QIASymphony SP/AS Ergebnisdateien. Nur Proben mit einem gültigen Status dürfen verwendet werden.

Das *artus* VZV QS-RGQ Kit kann auf dem Rotor-Gene Q laufen, wobei eine manuelle Analyse mit der Rotor-Gene Q Software ab 2.1 verwendet wird. Die folgenden Abschnitte beschreiben eine Interpretation der Ergebnisse mit der Rotor-Gene Q Software ab Version 2.1.

* Ggf. Rotor-Gene Q 5plex HRM Instrument mit Produktionsdatum ab Januar 2010. Das Herstellungsdatum kann aus der Seriennummer auf der Rückseite des Geräts abgeleitet werden. Die Seriennummer hat das Format „MMJJNNN“, wobei „MM“ für den Produktionsmonat in Ziffern, „JJ“ für die letzten beiden Ziffern des Produktionsjahres und „NNN“ für die eindeutige Instrumentenkennung steht.

Signalnachweis und Schlussfolgerungen

Signal im Kanal Cycling Green	Signal im Kanal Cycling Orange	Quantitatives Ergebnis (Kopien/ml)	Interpretation
Ja	Ja	< 12,7	Gültiges Ergebnis: VZV-DNA nachgewiesen, < 127 Kopien/ml. Quantifizierung nicht möglich, da das quantitative Ergebnis unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Die Reproduzierbarkeit des positiven Ergebnisses ist nicht gesichert.
Ja	Ja	$\geq 12,7$ und < 127	Gültiges Ergebnis: VZV-DNA nachgewiesen, < 127 Kopien/ml. Quantifizierung nicht möglich, da das quantitative Ergebnis unterhalb des linearen Bereichs des Assays liegt.
Ja	Ja/Nein*	≥ 127 und $\leq 6,92 \times 10^6$	Gültiges Ergebnis: VZV-DNA in der berechneten Konzentration nachgewiesen. Das quantitative Ergebnis liegt innerhalb des linearen Assay-Bereichs.
Ja	Ja/Nein*	$> 6,92 \times 10^6$	Gültiges Ergebnis: VZV-DNA nachgewiesen, $> 6,92 \times 10^6$ Kopien/ml. Quantifizierung nicht möglich, da das quantitative Ergebnis oberhalb des linearen Bereichs des Assays liegt. [†]
Nein	Ja	–	Gültiges Ergebnis: Keine VZV-DNA nachweisbar. [‡]
Nein	Nein	–	Ungültiges Ergebnis: Eine Aussage zum Ergebnis ist nicht möglich. [§]

* In diesem Fall ist die Detektion eines Signals im Kanal Cycling Orange unmaßgeblich, da eine hohe Ausgangskonzentration von VZV-DNA (positives Signal im Kanal Cycling Green) zu einem abgeschwächten oder ausbleibenden Fluoreszenzsignal der internen Kontrolle im Kanal Cycling Orange führen kann (Kompetition).

† Wenn eine Quantifizierung erwünscht ist, verdünnen Sie die Probe mit VZV-freiem Plasma und verarbeiten Sie diese erneut. Multiplizieren Sie das quantitative Ergebnis der erneut verarbeiteten Probe mit dem Verdünnungsfaktor.

‡ Wenn bei einer negativen Probe der C_T -Wert für die interne Kontrolle bei diesem Lauf mehr als 3 Zyklen über dem C_T -Wert für die interne Kontrolle der Kontrolle ohne Template liegt ($C_{T \text{ IC-Probe}} - C_{T \text{ IC-NTC}} > 3$), muss diese Probe als ungültig behandelt werden. Eine Aussage zum Ergebnis ist nicht möglich.

§ Informationen über Fehlerquellen und ihre Behebung finden Sie in der Hilfe zur Fehlersuche im artus VZV QS-RGQ Kit Handbuch.

Einrichten eines Schwellenwertes für die PCR-Analyse

Die optimalen Einstellungen für einen Schwellenwert bei einer gegebenen Kombination aus Rotor-Gene Q Instrument und *artus* QS-RGQ Kit müssen empirisch durch Testen jeder einzelnen Kombination ermittelt werden, da es sich um einen relativen Wert handelt, der vom diagnostischen Arbeitsablauf insgesamt abhängt. Der Schwellenwert kann auf einen vorläufigen Wert von 0,04 bei der Analyse des ersten PCR-Laufs eingestellt werden, aber dieser Wert muss in einer vergleichenden Analyse der nächsten Läufe des Arbeitsablaufes feinjustiert werden. Der Schwellenwert sollte manuell auf einen Wert gerade oberhalb des Hintergrundsignals der Negativkontrollen und der negativen Proben eingestellt werden. Der aus diesen Experimenten berechnete mittlere Schwellenwert kann sehr wahrscheinlich für die Mehrzahl zukünftiger Läufe verwendet werden; dennoch sollte der Anwender den gewonnenen Schwellenwert in regelmäßigen Zeitabständen überprüfen. Der Schwellenwert liegt üblicherweise im Bereich von 0,03–0,05 und sollte nach Rundung nicht mehr als drei Dezimalstellen aufweisen.

Quantifizierung

Die Quantifizierungsstandards (VZV QS 1–4) des *artus* VZV QS-RGQ Kits werden wie bereits aufgereinigte Proben behandelt und im gleichen Volumen eingesetzt (20 µl). Um eine Standardkurve auf Rotor-Gene Q Instrumenten zu erstellen, setzen Sie bitte alle 4 Quantifizierungsstandards ein und definieren Sie diese im Dialogfeld Edit Samples (Proben bearbeiten) des Rotor-Gene Q als Standards mit den angegebenen Konzentrationen (siehe Gerätehandbuch).

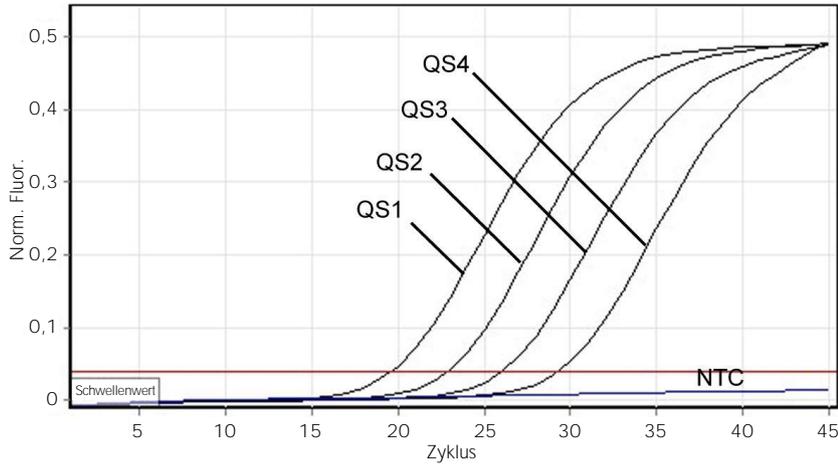
Hinweis: Die Quantifizierungsstandards sind als Kopien/µl im Eluat definiert. Zur Umrechnung der anhand der Standardkurve ermittelten Werte in Kopien/ml Probenmaterial muss die folgende Gleichung angewendet werden.

$$\text{Ergebnis im Probenmaterial (Kopien/ml)} = \frac{\text{Ergebnis im Eluat (Kopien/}\mu\text{l)} \times \text{ursprüngl. Elutionsvol. (90 }\mu\text{l)*}}{\text{Probenvolumen (ml)}}$$

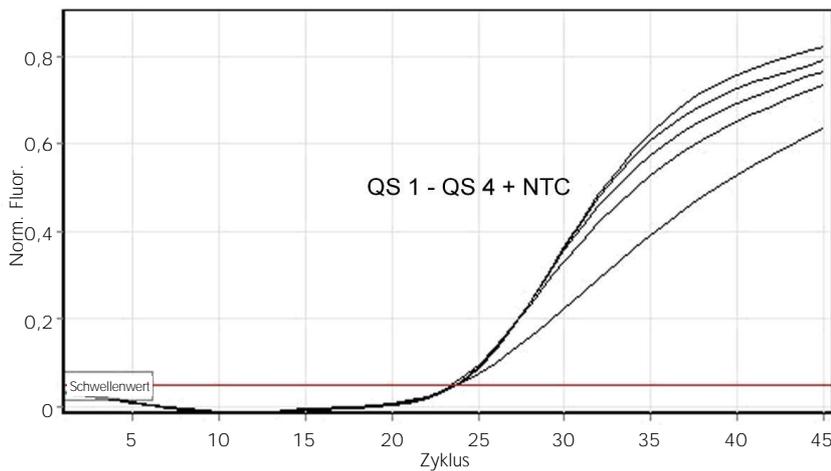
Es sollte grundsätzlich das anfängliche Probenvolumen in die oben stehende Gleichung eingesetzt werden. Darauf ist zu achten, wenn das Probenvolumen vor der Nukleinsäure-Aufreinigung verändert wurde (z. B. Volumenreduktion durch Zentrifugieren oder Volumenerhöhung durch Auffüllen auf das zur Isolierung erforderliche Volumen).

* Die Berechnung beruht auf dem anfänglichen Elutionsvolumen (90 µl).

Beispiele positiver und negativer PCR-Reaktionen



Nachweis der Quantifizierungsstandards (VZV QS 1–4) im Fluoreszenzkanal „Cycling Green“.
NTC: No template control (Kontrolle ohne Template) (Negativkontrolle).



Detektion der internen Kontrolle (Internal Control, IC) im Fluoreszenzkanal „Cycling Orange“ bei gleichzeitiger Amplifikation der Quantifizierungsstandards (VZV QS 1–4).
NTC: No template control (Kontrolle ohne Template) (Negativkontrolle).

Bearbeitungsverlauf des Dokuments

R2, April 2019 Fußnote zur Konfiguration von 216 Assays wurde entfernt. Änderung in neue QIASymphony-Protokollversionen. Aktualisierte erforderliche Materialien für eine Konfiguration von maximal 72 **Reaktionen. Informationen zur Nutzung des QMC „IC Calculator“-Tools** (Tool zur Berechnung der internen Kontrolle) wurden hinzugefügt. Aktualisierte Benennung von Corning Labware (zuvor Becton Dickinson). Es wurden spezielle Laufeinstellungen für Rotor-Gene Q hinzugefügt (Verwendung der Touchdown-Funktion, Datenerfassungen). Informationen zur Interpretation von Ergebnissen **beinhalten nun auch „Pathogen-positive und IC-negative Fallergebnisse“**. **Anweisungen zur Verwendung des Rotor-Gene AssayManager®** wurden entfernt; Wortwahl wurde zur Verdeutlichung von RT-PCR zu PCR geändert; Klarstellung des Unterschieds zwischen Proben- und Eluatkonzentration in der Quantifizierungsberechnung.

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische rechtliche Haftungsausschlüsse finden Sie im Handbuch oder der Gebrauchsanweisung des jeweiligen QIAGEN-Kit. Handbücher und Gebrauchsanweisungen zu QIAGEN Kit finden Sie im Internet unter www.qiagen.com oder können beim Technischen Service von QIAGEN oder bei Ihrem örtlichen Händler angefordert werden.

Marken: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony®, *artus*®, Rotor-Gene®, Rotor-Gene AssayManager® (QIAGEN Group); Corning® (Corning Inc.); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co.). Bei registrierten Namen, Marken usw., die in diesem Dokument genannt werden, ist nicht davon auszugehen, dass sie gesetzlich nicht geschützt sind, auch wenn sie nicht ausdrücklich als registrierter Name bzw. registrierte Marke gekennzeichnet sind.
04/2019 HB-0401-S02.002 © 2012-2019 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

