

# ***Biotest MMB Listeria monocytogenes (R)***

## **Manual**

Version 06.09

**Biotest MMB Listeria  
monocytogenes (R)  
Art. No. 944 032**

für den real-time PCR-Nachweis von *L. monocytogenes*-DNA/  
for the real-time PCR detection of *L. monocytogenes* DNA



## Inhaltsverzeichnis / Contents

### DEUTSCH

<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>3</b>
<b>NORMEN .....</b>	<b>3</b>
<b>KIT-VERSIONEN (V, R, LC) .....</b>	<b>3</b>
<b>SENSITIVITÄT .....</b>	<b>4</b>
<b>KOMPONENTEN UND LAGERUNG .....</b>	<b>4</b>
<b>QUALITÄTSKONTROLLE .....</b>	<b>5</b>
<b>HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN .....</b>	<b>5</b>
<b>PROTOKOLL .....</b>	<b>5</b>
<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>7</b>
<b>WEITERE INFORMATIONEN .....</b>	<b>8</b>
<b>BESTELLINFORMATIONEN .....</b>	<b>9</b>
<b>ENGLISH</b>	
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>10</b>
<b>NORMS AND REGULATIONS .....</b>	<b>10</b>
<b>SELECTION OF KIT VERSION (V, R, LC) .....</b>	<b>10</b>
<b>SENSITIVITY .....</b>	<b>11</b>
<b>COMPONENTS AND STORAGE .....</b>	<b>11</b>
<b>QUALITY CONTROL .....</b>	<b>12</b>
<b>WARNING AND PRECAUTIONS .....</b>	<b>12</b>
<b>PROTOCOL .....</b>	<b>12</b>
<b>INTERPRETATION OF RESULTS .....</b>	<b>14</b>
<b>FURTHER INFORMATION .....</b>	<b>15</b>
<b>ORDER INFORMATION .....</b>	<b>16</b>

#### Trademarks and Licensing

Applied Biosystems, VIC are registered trademarks; StepOne, FAM, ROX are trademarks of Applied Biosystems Corporation or its subsidiaries in the US and/or certain other countries.

Bio-Rad, iCycler iQ registered trademark, iQ5 is a trademark of Bio-Rad, Inc.

BHQ is a registered trademark of Biosearch Technologies, Inc.

RotorGene is a registered trademark of Corbett research.

Eppendorf, Mastercycler are registered trademarks of Eppendorf AG.

Roche, LightCycler is a registered trademark of Roche Molecular Systems, Inc.

Stratagene, Mx3000P, Mx3005P, Mx4000P are registered trademarks of Stratagene.

All other trademarks are the property of their respective owners.

The application in which this product is used is covered by patents issued and applicable in the United States and certain other countries. Because purchase of this product does not include a license to **perform any patented application, users of this product may be required to obtain a patent license.**

## Einleitung

Listeriose ist eine beim Menschen nicht sehr häufige (in Deutschland ca. 100-200 Fälle/Jahr), jedoch sehr schwere Infektionskrankheit mit einer hohen Sterblichkeitsrate, die überwiegend durch Lebensmittel übertragen wird. Der Erreger ist das Bakterium *Listeria monocytogenes* (verschiedene Serovare). Immungeschwächte Personen, alte Menschen, Schwangere, Ungeborene und Kleinstkinder sind sehr anfällig für diese Erkrankung. Die Infektion wird auf den Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln zurückgeführt.

Die real-time PCR-Methode ermöglicht im Gegensatz zu klassischen mikrobiologischen Kulturmethode eine sensitive Überprüfung von Rohstoffen und prozessierten Lebensmitteln auf Abwesenheit von *Listeria monocytogenes* in kürzester Zeit.

Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR-Geräten verwendet werden, wobei verschiedene Versionen des Kits für unterschiedliche Gerätetypen erhältlich sind (s. Kapitel 3). Die interne Kontrolle, durch die eine potenzielle Inhibition der PCR-Reaktion überprüft wird, ist hierfür mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert.

## Normen

Das Biotest MMB *Listeria monocytogenes* (R) Testkit erfüllt folgende Normen:

ENORM EN ISO 11290-1 und ENORM EN ISO 11290-2 Ausgabe: 2005-02-01 Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Horizontales Verfahren für den Nachweis und die Zählung von *Listeria monocytogenes* - Teil 1 und 2: Nachweisverfahren - (ISO 11290-1:1996 + Amd.1:2004)

DIN EN ISO 20837, 2006-08

Polymerase Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln - Anforderung an die Probenvorbereitung für den qualitativen Nachweis (ISO 20837:2006)

DIN EN ISO 20838, 2006-08

Polymerase Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln - Anforderung an Amplifikation und Nachweis bei qualitativen Verfahren (ISO 20838:2006)

DIN EN ISO 22174, 2005-05 = BVL L 00.00-45

Polymerase Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln - Allgemeine Anforderungen und Begriffe (ISO 22174:2005)

BVL L 00.00-95 (V), Technische Regel 2006-12 = §64 Amtliche Untersuchungsmethoden LFGB (= §35 LMBG)

Untersuchung von Lebensmitteln - qualitativer Nachweis von *Listeria monocytogenes* in Lebensmitteln mittels PCR-Verfahren

## Kit-Versionen (V, R, LC)

In allen Biotest MMB *Listeria monocytogenes*-Kits wird der Fluoreszenzfarbstoff FAM für den Nachweis der *Listeria monocytogenes*-DNA verwendet und bei 522 nm detektiert. In dem Biotest MMB *Listeria monocytogenes* (R) Kit wird der Fluoreszenz-Farbstoff ROX für die Detektion der internen Amplifikationskontrolle verwendet. Für die Verwendung des Kits mit anderen Detektionsplattformen sind verschiedene Varianten erhältlich, deren jeweilige Fluoreszenz-Markierung der internen Kontrolle auf anderen Kanälen detektiert wird:

Biotest MMB *Listeria monocytogenes* (V): VIC-Kanal (553 nm)  
 Biotest MMB *Listeria monocytogenes* (R): ROX-Kanal (602 nm)  
 Biotest MMB *Listeria monocytogenes* (LC): LightCycler-Detektion (640 nm)

Die folgende Tabelle gibt darüber Auskunft, welche Variante für das verwendete real-time PCR-Gerät benötigt wird:

Gerätebezeichnung	Kit-Version		
	(V)	(R)	(LC)
Applied Biosystems ABI 7000, 7300, 7500 7700, 7900 SDS, StepOne	x		
BioRad iCycler iQ iQ5		x x	
Roche LightCycler 1.5 LightCycler 2.0 LightCycler 480		x	x x
Eppendorf Mastercycler ep realplex <sup>2</sup> Mastercycler ep realplex <sup>4</sup>	x x		
Stratagene MxSerie	x		
Corbett Research RotorGene /QIAGEN Rotor-Gene Q	x		

## Sensitivität

Die Nachweisgrenze der PCR liegt bei  $\leq 5$  DNA-Kopien. Die Sensitivität des Gesamtverfahrens wird durch die verwendete Probenmatrix, den Prozessierungsgrad des Untersuchungsmaterials, die Anreicherungszeit, die Qualität der DNA-Präparation und den DNA-Gehalt beeinflusst.

## Komponenten und Lagerung

- 2x *Listeria monocytogenes* (R) Reaction Mix (1,0 ml)
- 1x Positive Control DNA (180  $\mu$ l)
- 1x FDE (Fluorescence Detection Enhancer) (140  $\mu$ l)
- 1x Taq DNA Polymerase (10  $\mu$ l)

Die Reagenzien sind lichtgeschützt bei  $-20$  °C zu lagern.

Benötigte Materialien, die nicht im Testkit enthalten sind:

- Real-time PCR-Gerät mit den Detektionskanälen 522 nm und 602 nm
- Verstellbare Pipetten
- Sterile DNA-freie Filterspitzen
- Geeignetes real-time PCR-Verbrauchsmaterial (Platten, Gefäße, optisch klare Verschlussmöglichkeiten, Kapillaren)
- Zentrifuge mit Einsätzen für die verwendeten Gefäße, Platten oder Kapillaren (evt. mit geeigneten Adaptern)

## Qualitätskontrolle

Dem Biotest Qualitätsmanagement-System entsprechend wird jedes Lot der Biotest MMB *Listeria monocytogenes* Kits auf festgelegte Spezifikationen getestet, um eine gleichbleibende Produktqualität zu sichern.

## Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Nicht für *in vitro* Diagnostik geeignet.

**Achtung:** Der Test sollte nur von ausgebildetem und autorisiertem Laborpersonal durchgeführt werden.

**Achtung:** Alle Reagenzien sollten nach den Richtlinien guter Laborpraxis gehandhabt und unter entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen verwendet werden.

**Achtung:** Verwenden Sie Reagenzien nicht mehr nach Ablauf des Haltbarkeitsdatums auf dem Etikett.

**Achtung:** Verwenden Sie Reagenzien nicht bei nachweislicher Trübung oder mikrobiologischer Kontamination.

**Achtung:** Post-PCR-Bereiche sollten räumlich von den Prä-PCR-Bereichen des Labors getrennt sein.

**Achtung:** Pipetten, die für Post-PCR-Arbeitsschritte verwendet werden, dürfen nicht für die Prä-PCR-Arbeitsschritte benutzt werden.

## Protokoll

### Isolierung der *Listeria monocytogenes*-DNA

Für die Isolierung der *Listeria monocytogenes*-DNA aus der Voranreicherung wird das Biotest MMB Prep *Listeria* Kit (Art. Nr. 944 515) empfohlen.

## Amplifikation der Ziel-Sequenz

### PCR-Setup

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen setzt sich aus der Gesamtzahl der Proben und den Kontrollreaktionen zusammen. Es werden folgende Kontrollen empfohlen: Positivkontrolle, Negativkontrolle und Extraktionskontrolle. Der Master-Mix enthält eine interne Amplifikationskontrolle, die der Überprüfung einer Inhibition der PCR-Reaktion dient, welche durch Kontaminationen in der DNA-Lösung hervorgerufen werden kann.

Es wird empfohlen, den Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen eventuellen Pipettierverlust auszugleichen.

Vor der Benutzung werden die Reagenzien aufgetaut, gevortext und kurz zentrifugiert.

Beispiel für die Berechnung und Herstellung von 10 Reaktionen:

Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
Listeria monocytogenes (R) Reaction Mix	18,8 µl	206,8 µl
FDE (Fluorescence Detection Enhancer)	1,1 µl	12,1 µl
Taq DNA Polymerase	0,1 µl	1,1 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

Master-Mix mit dem Vortex gut mischen und anschließend kurz abzentrifugieren.

Je 20 µl Master-Mix werden in das jeweilige Reaktionsgefäß (Gefäße/Platten, Kapillaren) pipettiert.

Das Gefäß der Negativkontrolle wird sofort verschlossen.

Je 5 µl der Proben-DNA werden in die vorgesehenen Reaktionsgefäße pipettiert und die Gefäße direkt nach der Zugabe verschlossen.

Für die Positivkontrolle wird 5 µl Positive Control DNA in das vorgesehene Reaktionsgefäß pipettiert und sofort verschlossen.

Die Proben werden durch kurzes Zentrifugieren der Reaktionsgefäße mit wenigen Umdrehungen pro Minute am Boden der Gefäße gesammelt.

Die Reaktionsgefäße werden in das PCR-Gerät eingesetzt und die PCR entsprechend den Geräteeinstellungen gestartet.

Die Einstellung der Geräte erfolgt in Abhängigkeit der verwendeten Kitvariante.

## Geräteeinstellung

Für das Biotest MMB *Listeria monocytogenes* (R) Kit werden folgende Geräteeinstellungen verwendet:

Initial Denaturation (HOLD)	5 min, 95 °C
Cycles	45
Denaturation	15 s, 95 °C
Annealing/Extension (CYCLE)	30 s, 60 °C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum
Fluorescence Detection Setup	Detection: end of extension phase Reporter Dye 1 (522 nm): FAM (Nachweisgen) Reporter Dye 2 (602 nm): ROX (interne Amplifikations-Kontrolle) Quencher Dye 1+2: BHQ  <b>Roche LC480</b> Reporter Dye 1 (483, 533 nm); Reporter Dye 2 (558, 610 nm)

## Ergebnisse

Die Auswertung der Ergebnisse wird mit der Analyse-Software der jeweiligen real-time PCR- Geräte nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Negativ- und Positivkontrollen müssen die korrekten Ergebnisse zeigen:

Eine Probe wird **positiv** bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im Nachweissystem zeigt (Signal im FAM-Kanal).

Eine Probe wird als **negativ** bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im Nachweissystem zeigt und die zugehörige interne Amplifikationskontrolle (Inhibitionskontrolle) im ROX-Kanal **positiv** ist.

Sollten die Probe und die interne Amplifikationskontrolle **negativ** sein, sind in der Probe PCR-Inhibitoren vorhanden. In diesem Fall kann keine Aussage getroffen werden. Die Isolierung und Reinigung der DNA aus der entsprechenden Probe muss wiederholt und ggf. optimiert werden.

## **Weitere Informationen**

Für allgemeine Anfragen oder Bestellungen kontaktieren Sie bitte Ihren lokalen Biotest-Händler:

Kunden aus Deutschland erreichen den Customer Service unter:

Telefon: +49 (0) 6103 801-496

Fax: +49 (0) 6103 801-505

mail@biotest.de

Für technische/applikative Anfragen kontaktieren Sie bitte unseren technischen Support unter:

Telefon: +49 (0) 6221 72651-30

Fax: +49 (0) 6221 72651-39

hycon@biotest.de



## Introduction

Listeriosis is a infectious disease with low incidence (in Germany 100-200 cases/year) but high mortality rates, which is caused by food contaminated with bacteria of the species *Listeria monocytogenes* (different serovars). Immunocompromised people, elderly, pregnant, foetuses and neonates are especially susceptible for Listeriosis.

The real-time PCR method enables, in contrast to classic microbiological culture methods, the rapid and sensitive testing of raw material and processed food for absence of *Listeria monocytogenes*.

The test procedure can be performed using all common real-time cyclers. Three distinct versions of the test kit are available for different instrument types (see chapter 3): The internal controls for exclusion of a potential inhibition of the PCR reactions are labelled with different suitable fluorescent dyes.

## Norms and Regulations

The Biotest MMB *Listeria monocytogenes* test kit fulfills the following norms and regulations:

ENORM EN ISO 11290-1 und ENORM EN ISO 11290-2 Ausgabe: 2005-02-01 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 1 and part 2: Detection method (ISO 11290-1:1996 + Amd.1:2004)

DIN EN ISO 20837, 2006-08

Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of pathogen microorganisms in food – Requirements to the preparation of samples for the qualitative detection (ISO 20837:2006) German version EN ISO 20837, 2006-08

DIN EN ISO 20838, 2006-08

Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of pathogen microorganisms in food – Requirements to the amplification and detection of qualitative method (ISO 20838:2006); German version EN ISO 20838:2006)

DIN EN ISO 22174, 2005-05 = BVL L 00.00-45

Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of pathogen microorganisms in food – General Requirements and Definitions (ISO 22174:2005); German version EN ISO 22174:2005

BVL L 00.00-95 (V), Technical rule, 2006-12 = §64 official research methods LFGB (= §35 LMBG)

Detection of food - qualitative proof of *Listeria monocytogenes* in food by - Polymerase chain reaction (PCR)

## Selection of Kit Version (V, R, LC)

All Biotest MMB *Listeria monocytogenes* kits contain FAM-labeled probes for the detection of *Listeria monocytogenes* DNA at 522 nm. The Biotest MMB *Listeria monocytogenes* (R) kit uses the fluorescent dye ROX for the detection of the internal amplification control. For use with other detection platforms different variants are available, containing fluorescent labels which are detected on other channels:

Biotest MMB <i>Listeria monocytogenes</i> (V):	VIC channel (553 nm)
Biotest MMB <i>Listeria monocytogenes</i> (R):	ROX channel (602 nm)
Biotest MMB <i>Listeria monocytogenes</i> (LC):	LightCycler detection (640 nm)

The following table provides information, which kit variant is recommended for the respective instruments:

Instrument Description	Kit version		
	(V)	(R)	(LC)
Applied Biosystems ABI 7000, 7300, 7500 7700, 7900 SDS, Step One	x		
BioRad iCycler iQ iQ5		x x	
Roche LightCycler 1.5 LightCycler 2.0 LightCycler 480		x	x x
Eppendorf Mastercycler ep realplex <sup>2</sup> Mastercycler ep realplex <sup>4</sup>	x x		
Stratagene Mx Series	x		
Corbett Research RotorGene / QIAGEN Rotor-Gene Q	x		

## Sensitivity

The detection limit is  $\leq 5$  DNA copies. The sensitivity of the whole procedure is influenced by the sample matrix, processing grade, DNA isolation and DNA content.

## Components and Storage

- 2x Listeria monocytogenes (R) Reaction Mix (1.0 ml)
- 1x Positive Control DNA (180  $\mu$ l)
- 1x FDE (Fluorescence Detection Enhancer) (140  $\mu$ l)
- 1x Taq DNA Polymerase (10  $\mu$ l)

Store all reagents at  $-20$  °C protected from light.

Required equipment and materials, not included in the kit:

- Real-time cycler with detection channels 522 nm and 602 nm
- Adjustable pipettes
- Sterile DNA-free filter tips
- Suitable real-time PCR consumables (plates, tubes, optical clear sealing options, capillaries)
- Centrifuge with suitable rotors for tubes, plates or capillaries (if necessary, with adapters).

## Quality Control

According to the Quality Management System, each lot of Biotest MMB *Listeria monocytogenes* Kits is tested against predetermined specifications to ensure consistent product quality.

## Warning and Precautions

For research use only, not for *in vitro* diagnostic use.

**Caution:** The test must be performed by well-trained and authorized laboratory technicians.

**Caution:** All reagents should be handled in accordance with good laboratory practice taking appropriate precautions. Do not pipette by mouth.

**Caution:** Do not use reagents past the expiration date printed on the label.

**Caution:** Do not use reagents with any evidence of turbidity or microbial contamination.

**Caution:** Post-PCR areas should be physically separated from Pre-PCR areas of the laboratory.

**Caution:** Pipettes used for Post-PCR manipulations should not be used for Pre-PCR manipulations.

## Protocol

### Isolation of *Listeria monocytogenes* DNA

For isolating *Listeria monocytogenes* DNA the Biotest MMB Prep *Listeria* Kit (Art. No. 944 515) is recommended.

## Amplification of the Target Sequence

### PCR Setup

For preparation of the master mix determine the number of samples and controls (positive control, negative control and extraction control). The master mix contains an internal amplification control to monitor inhibition of the PCR due to possible contaminants in the DNA sample.

It is recommended to prepare 10 % additional volume to the master mix in order to compensate pipetting losses.

Before use, all reagents must be thawed, vortexed and centrifuged briefly.

Example for calculation and preparation of 10 reactions:

Components for master mix	Volume per reaction	10 reactions (+10 %)
Listeria monocytogenes (R) Reaction Mix	18.8 µl	206.8 µl
FDE (Fluorescence Detection Enhancer)	1.1 µl	12.1 µl
Taq DNA Polymerase	0.1 µl	1.1 µl
<b>Total volume</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

Mix thoroughly and spin down briefly.

Pipette 20 µl master mix to each reaction tube, well, or capillary.

Close the reaction vessel for the negative control directly.

Add 5 µl DNA sample. Close reaction vessel directly after sample transfer.

Add 5 µl Positive Control DNA to the last reaction vessel. Close reaction vessel directly after transfer.

Spin samples briefly to collect them at the bottom of the tube.

Place reaction vessels in the PCR instrument and start the cycling program.

## Cycler Set-up

For the Biotest MMB *Listeria monocytogenes* (R) kit use the following cycler set-up:

Initial Denaturation (HOLD)	5 min, 95 °C
Cycles	45
Denaturation	15 s, 95 °C
Annealing/Extension (CYCLE)	30 s, 60 °C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum
Fluorescence Detection Setup	Detection: End of extension phase Reporter Dye 1 (522 nm): FAM (detection system) Reporter Dye 2 (602 nm): ROX (internal amplification control) Quencher Dye 1+2: BHQ  <b>Roche LC480</b> Reporter dye 1 (483, 533 nm) Reporter dye 2 (558, 610 nm)

## Interpretation of Results

The evaluation must be made according to the analysis program provided by the real-time PCR instrument manufacturer. All control reactions need to show the correct results.

A sample is evaluated **positive**, if the sample DNA shows amplification in the detection system (FAM).

A sample is evaluated **negative**, if the sample DNA shows no amplification in the detection system and the internal amplification control (inhibition control, ROX channel) of the sample is positive.

If the sample DNA and the internal amplification control are negative the sample contains a PCR inhibiting contaminant. Under these circumstances an evaluation of the samples is not possible. The DNA preparation for the sample must be repeated or improved.

## **Additional Information**

For any inquiries or to place an order, contact your local Biotest distributor.  
Domestic customers in Germany may contact Customer Service at:

Phone: +49 (0) 6103 801-496

Fax: +49 (0) 6103 801-505

Email: [mail@biotest.de](mailto:mail@biotest.de)

For technical or applicational inquiries please contact our Technical Support at:

Phone: +49 (0) 6221 72651-30

Fax: +49 (0) 6221 72651-39

Email [hycon@biotest.de](mailto:hycon@biotest.de)

For further questions please send an e-mail to [hycon@biotest.de](mailto:hycon@biotest.de).

## Order Information

Product Name	Article No.	Package Size
Biotest MMB Prep Bacteria	944 501	100 preparations
Biotest MMB Prep Salmonella	944 505	100 preparations
Biotest MMB Prep Campylobacter	944 511	100 preparations
Biotest MMB Prep Listeria	944 515	100 preparations
Biotest MMB Prep E. coli	944 521	100 preparations
Biotest MMB Prep DNA/RNA virus	944 702	50 preparations
Biotest MMB Salmonella (V)	944 011	100 reactions
Biotest MMB Salmonella (R)	944 012	100 reactions
Biotest MMB Salmonella (LC)	944 013	100 reactions
Biotest MMB Campylobacter (V)	944 021	100 reactions
Biotest MMB Campylobacter (R)	944 022	100 reactions
Biotest MMB Campylobacter (LC)	944 023	100 reactions
Biotest MMB Listeria monocytogenes (V)	944 031	100 reactions
Biotest MMB Listeria monocytogenes (R)	944 032	100 reactions
Biotest MMB Listeria monocytogenes (LC)	944 033	100 reactions
Biotest MMB STEC Screening (V)	944 041	100 reactions
Biotest MMB STEC Screening (R)	944 042	100 reactions
Biotest MMB STEC Screening (LC)	944 043	100 reactions
Biotest MMB Staphylococcus aureus (V)	944 051	100 reactions
Biotest MMB Listeria Screening (V)	944 061	100 reactions
Biotest MMB Vibrio cholerae (V)	944 071	100 reactions
Biotest MMB Legionella pneumophila (V)	944 081	100 reactions
Biotest MMB Clostridium perfringens (V)	944 091	100 reactions
Biotest MMB Bacillus cereus (V)	944 101	100 reactions
Biotest MMB Legionella Screening (V)	944 111	100 reactions
Biotest MMB Norovirus (V)	944 204	50 reactions

## Biotest Subsidiaries

---

### Headquarters Germany

#### **Biotest AG**

Landsteinerstr. 5  
63303 Dreieich  
Germany  
Tel.: +49 6103 8 01-0  
Fax: +49 6103 8 01-130  
www.biotest.de  
mail@biotest.de

#### **Biotest AG**

Technology Center Microbiology  
Wernher von Braun Straße 9  
69214 Eppelheim/Germany  
Tel.: +49 6221 726 5130  
Fax: +49 6221 726 5139  
Sales: +49 6103 801 496  
www.biotest.com  
hycon@biotest.de

---

### **Austria**

Biotest Austria GmbH  
Einsiedlergasse 58  
1053 Wien  
Tel.: +43 1-5 4 51 56 10  
Fax: +43 1-5 4 51 56 139  
info@biotest.at

### **Great Britain**

Biotest (UK) Ltd.  
Unit 28  
Monkspath Business Park  
Highlands Road/  
Shirley, Solihull  
West Midlands B90 4NZ  
Tel.: +44 121-7 33 33 93  
Fax: +44 121-7 33 30 66  
biotestuk@biotestuk.com

### **Japan**

Biotest K.K. (Japan)  
Daini Yasuda Bldg. 2F  
3-32-13, Tsuruya-cho, Kanagawa-  
ku,  
Yokohama-shi Kanagawa-ken  
221-0835  
Tel: +81-45-317-5111  
Fax: +81-45-317-5110  
elmar\_dresbach@biotest.de

### **Benelux**

Biotest Seralc°nv/sa  
Generaal De Wittelaan 17B bus 14  
2800 Mechelen  
Belgium  
Tel: +32-15 28 50 50  
Fax: +32 15 28 50 55  
info@biotest.be

### **Hungary**

Biotest Hungaria Kft.  
Torbágy u. 15/A  
2045 Törökbálint  
Tel.: +36 23 511-311  
Fax: +36 23 511-310  
biotest@biotest.hu

### **Switzerland**

Biotest (Schweiz) AG  
Schützenstr. 17  
5102 Rapperswil  
Tel.: +41 62-88 90 000  
Fax: +41 62-88 90 001  
mail@biotest.ch

### **France**

Biotest S. a. r. l.  
Zone Industrielle Centre  
375, Rue Morane Saulnier  
BP 65  
78534 Buc Cedex  
Tel.: +33 1-39 20 20 80  
Fax: +33 1-39 20 20 81  
info@biotest.fr

### **Italy**

Biotest Italia S.r.l.  
Via Leonardo da Vinci, 43  
20090 Trezzano sul Naviglio  
Tel.: +39 02 484291  
Fax: +39 02 48402783  
info@biotest-italia.com

### **USA**

Biotest Diagnostics Corporation  
400 Commons Way  
Rockaway, NJ 07866  
Tel: +1-973-625-1300  
Fax: +1-973-625-9454  
info@biotestUSA.com