第五十七条第一号中「動物用生物学的製剤」の下に「（牛、水牛、鹿、馬、めん羊、山羊、豚、いのしし、鶏、あひる、うずら、きじ、だちょう、ほろほろ鳥、七面鳥、犬、うさぎ及び蜜蜂に使用するものに限る。）」を加え、同条第二号中「牛疫予防液」の下に「、牛肺疫予防液、口蹄疫予防液」を加える。

別記様式第三十号二中「（３５ページ）」を「（３５ｂページ）」に改める。

別表第一ヨーネ病の項術式の欄第一項中「4又は5」を「4、5又は6」に改め、同欄中第二項を次のように改める。

2　リアルタイムＰＣＲ法による検査

ヨーネ菌ＤＮＡをサイバーグリーンにより検出するヨーネ病診断用リアルタイムＰＣＲキットを用いて実施する。

別表第一ヨーネ病の項術式の欄第五項中「エライザ法による検査」を「リアルタイムＰＣＲ法による検査」に改め、「ヨーニン検査」の下に「、エライザ法による検査」を加え、同項を同欄第六項とし、同欄中第四項を第五項とし、第三項の次に次の一項を加える。

4　エライザ法による検査

牛についてのヨーニン検査を実施する場合に併せて実施することができる。

別表第一ヨーネ病の項要領の欄第三項を次のように改める。

3　リアルタイムＰＣＲ法による検査の場合

一　ヨーネ菌核酸抽出試薬を用いて、検体の糞便から糞便抽出ＤＮＡ液を作製すること。

二　リアルタイムＰＣＲ反応液（ＤＮＡポリメラーゼ、サイバーグリーン、プライマー、ウラシル－Ｎ－グリコシラーゼ、リボヌクレアーゼフリー水を含むもの）〇・〇四五ccに一で作成した糞便抽出ＤＮＡ液〇・〇五ccを混合したもの（以下「検体調整液」という。）及びリアルタイムＰＣＲ反応液〇・〇四五ccに指示陽性ＤＮＡ液（あらかじめヨーネ菌のＤＮＡ濃度が明らかであるＤＮＡ液を十倍段階希釈したもの）を〇・〇五cc混合したもの（以下「指示陽性調整液」という。）を、それぞれ〇・二cc容量のＰＣＲ用チューブ二本又はＰＣＲ用九十六穴プレートの二穴に〇・〇二五ccずつ分注すること。

三　二のチューブ又はプレートをリアルタイムＰＣＲ装置により、五十度の温度で二分間、九十五度の温度で十五分間感作した後、九十五度の温度での三十秒間及び六十八度の温度での一分間の感作を四十五回繰り返すこと。

四　三の感作後に、二の検体調整液の蛍光強度が上昇したもののうち、六十度から九十八度までの間で解離曲線解析を行つて検体調整液が指示陽性調整液の解離温度と同様の解離温度を示した検体をＤＮＡ陽性とし、それ以外の検体をＤＮＡ陰性とすること。

五　四でＤＮＡ陽性となつた検体について、指示陽性調整液を用いた用量－反応式からヨーネ菌ＤＮＡ濃度を計算し、検体調整液〇・〇〇二五cc中のＤＮＡ量が〇・〇〇一ピコグラム以上と判定された検体を陽性とし、それ以外の検体を陰性とすること。

別表第一ヨーネ病の項要領の欄第六項中「牛にあつては初回検査の三十日後（ヨーニン検査を実施していない場合は十四日後）にエライザ法による検査、」を「リアルタイムＰＣＲ法による検査（」に改め、「山羊にあつては」の下に「、細菌検査（分離培養）、リアルタイムＰＣＲ法による検査、」を加え、「九十日後に」を「九十日後の」に改め、「補体結合反応検査」の下に「又は初回検査後二週間隔で三回以上の補体結合反応検査」を加え、同項を同欄第七項とし、同欄中第五項を第六項とし、第四項の次に次の一項を加える。

5　エライザ法による検査の場合

一　保存液の除去後、洗浄液で洗浄したヨーネ病診断用抗原を固相化した検査用プレート（以下「プレート」という。）に、エライザ緩衝液（以下「緩衝液」という。）で所定の倍数に希釈した指示血清及び被検牛血清（マイコバクテリウム・フレイ菌抽出液で吸収処理したもの）を分注した後、密封し、二時間二十五度の温度で感作すること。

二　一により感作したプレートを洗浄液で洗浄し、これに緩衝液で所定の倍数に希釈した酵素標識抗体を分注した後、密封し、二時間二十五度の温度で感作すること。

三　二により感作したプレートを洗浄液で洗浄し、これに基質溶液（使用する直前に調整したもの）を分注した後、十五分間二十五度の温度で反応させ、反応停止液を分注し、所定の波長で測定した吸光度値により判定すること。

四　吸光度値が〇・三五以上であるものを陽性とし、〇・三五未満であるものを陰性とすること。

別表第一ヨーネ病の項判定の欄第一項第五号を削り、同欄中第四号を第五号とし、第三号を第四号とし、第二号の次に次の一号を加える。

三　リアルタイムＰＣＲ法による反応が陽性となつたもの

別表第一ヨーネ病の項判定の欄第一項第六号中「についての」を「であるめん羊又は山羊について、」に、「四又は2の四、五若しくは六」を「五又は2の三、四若しくは五」に改め、同欄第二項中第一号を削り、第二号を第一号とし、第三号から第六号までを一号ずつ繰り上げる。

附　則

この省令は、公布の日から施行する。ただし、第四十七条の表の改正規定は平成二十五年三月七日から、別表第一の改正規定は平成二十五年四月一日から施行する。