○・○○五ミリリットルを混合したもの（以下「検体調整液」という。）及びリアルタイムＰＣＲ反応液○・○四五ミリリットルに指示陽性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○・○○五ミリリットル混合したもの（以下「指示陽性調整液」という。）を、それぞれ○・二ミリリットル容量のＰＣＲ用チューブ二本又はＰＣＲ用九十六穴プレートの二穴に○・○二五ミリリットルずつ分注すること。

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○・○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○・○○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○・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○・○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

3　1及び2に該当しないものは、ヨーネ病の患畜又は疑似患畜でないものとする。