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陽性解離温度を示した検体を陽性とし、陰性解離温度を示した検体を陰性とすること。

3　リアルタイムＰＣＲ法（ヨーネ病診断用リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応キット（プローブを用いるものに限る。）による方法）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、ウラシル－Ｎ－グリコシラーゼ、インターナルコントロール、プライマー、プローブを含むものをいう。以下この号において同じ。）〇・〇四五ミリリットルに一で作製した糞便抽出ＤＮＡ液〇・〇〇五ミリリットルを混合したもの（以下この項において「検体調整液」という。）、リアルタイムＰＣＲ反応液〇・〇四五ミリリットルに指示陽性ＤＮＡ液〇・〇〇五ミリリットルを混合したもの（以下この項において「指示陽性調整液」という。）及びリアルタイムＰＣＲ反応液〇・〇四五

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・〇四五ミリリットルに一で作成した糞便抽出ＤＮＡ液〇・〇〇五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反応液〇・〇四五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）を〇・〇〇五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、それぞれ〇・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〇・