ミリリットルに指示陰性液〇・〇〇五ミリリットルを混合したものを、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・〇二五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、二の検体調整液が分注されたチューブ一本又はプレート一穴以上で陽性反応検出用波長の蛍光強度が上昇した検体をＤＮＡ陽性とし、二の検体調整液が分注されたチューブ二本又はプレート二穴で陰性反応検出用波長の蛍光強度が上昇した検体を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・〇二五ミリリットル中の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。

〇二五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、検体調整液〇・〇二五ミリリットル中の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。