

检测马立克氏病毒抗体的酶联免疫 吸附试验(ELISA)

程由铨

(福建省农科院畜牧兽医研究所)

L.F.Lee E.J.Smith R.L.Witter

(美国农业部农业研究署地区家禽研究所)

提 要

本文报导了检测马立克氏病毒(MDV)抗体的酶联免疫吸附试验(ELISA)。试验抗原为感染MDV的鸡胚成纤维(CEF)细胞,当阳性血清以1:400稀释时,最佳反应的细胞数为每孔 5×10^4 。我们比较了提纯的MDV抗原(PVAg)和感染MDV的全细胞抗原(WcAg),结果WcAg特异性反应强,非特异性反应弱。经WcAg包被的微量ELISA滴定板孔保存于4℃和-20℃,至少3个月不会降低抗原滴度。判定阳性血清的O.D.值为0.2。ELISA的敏感性比免疫荧光(IF)试验高20~40倍。抗血清对同型病毒抗原的滴度比对异型病毒抗原滴度高。这种ELISA方法适合于检测鸡血清中的MDV抗体和大量筛选马立克氏病毒单克隆抗体(MDV-McAb)。

马立克氏病(MD)是由疱疹病毒科马立克氏病毒(MDV)所引起鸡的内脏淋巴瘤,和外周神经淋巴增生为特征的传染性疾病^[4,14]。目前有几种检测MDV抗体的血清学方法。如琼脂沉淀试验(AGP),它具有特异性、操作方便等优点,但是,其敏感性低。免疫荧光抗体(IFA)和血清中和试验(SN)适合于检测MDV抗原、抗体,但是,费用高,时间长。

酶联免疫吸附试验(ELISA)已用于网状内皮增生病毒(REV)^[21]、传染性气管炎病毒(IBV)^[6,7,12,13]、呼肠孤病毒(REOV)^[19]、传染性腔上囊病毒(IBDV)^[8]、禽腺病毒(ADV)^[6]和火鸡出血性肠炎病毒(HEVT)^[16]等抗体的检测。但是,至今未见ELISA方法检测MDV抗体的报导。这主要是由于MDV与宿主细胞紧密结合的特性有关,所以很难获得大量纯的MDV。本文作者已成功地建立了敏感性高、特异性强、快速、经济、简便检测MDV抗体的ELISA方法。试验用全细胞抗原(WcAg),而不是提纯病毒

抗原 (PVAg), 并与IFA试验进行了敏感性、特异性的比较, 讨论了判定标准。它适合于检测鸡血清中的MDV抗体和大量筛选MDV—McAb。

材 料 和 方 法

一、细胞和病毒 CEF细胞用11日龄的SPAFAS白来克亨鸡胚胎经胰蛋白酶消化获得。鸭胚成纤维 (DEF) 细胞用13日龄的khaki—Campbell鸭胚胎, 其消化方法同上。原代和次代CEF和DEF细胞的生长液为4%灭活小牛血清和适量青、链霉素的199或F10培养基。维持液除了小牛血清浓度减至1%外, 其他成份同生长液。试验用MDV毒株包括致病性JM/111S株⁽¹⁷⁾、弱毒株MD11/75C⁽²³⁾和非致病性毒株SB-1, 火鸡疱疹病毒 (HVT) FC126株⁽²³⁾。

二、试验鸡和血清 试验鸡为151₅×7₂杂交品系白来克亨鸡, 经抗体检查为MDV、HVT、ALV、REV和其他禽致病性病毒抗体阴性, 这种品系的杂种鸡对MDV敏感性高。阳性血清获自一次接种不同MDV、HVT毒株的鸡, 试验鸡分别养于隔离器内至十周龄。阴性血清为未感染病毒的同品系鸡, 同样分别养于隔离器内, 另一部分阴性鸡血清取自无特定病原 (SPF) 的种鸡群。

三、全细胞抗原 (WcAg) 原代CEF或DEF单层细胞感染MDV或HVT后2~4天, 当单层细胞75%以上出现病变时 (CPE) 收获细胞, 重悬于有10%小牛血清、10%二甲亚砜 (DMSO) 的培养液中, 分装小瓶, 保存于气态氮容器内。试验时取出, 用pH7.2磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 洗1~2次, 细胞重悬于PBS中, 使每孔的细胞数为5~500000个/0.1毫升。微量ELISA滴定板于1000rpm离心20分钟, 倒尽上清液, 置室温 (22℃) 让其干燥后试验或保存于4℃或-20℃备用。常规试验每孔含 5×10^4 细胞, 大约为 1.7×10^8 蚀斑形成单位 (PFU) 病毒。

四、提纯病毒抗原 (PVAg) 当培养于100×75厘米转瓶中的原代CEF细胞形成单层后, 感染MDV或HVT, 具体按Lee⁽⁹⁾报导的方法。病毒提纯按Adam⁽¹⁾和Lee等⁽¹⁰⁾所描述的方法。病毒提纯后, 电子显微镜检查病毒微粒。

五、间接免疫荧光抗体试验 (IFA) 生长在盖玻片上的次代CEF或DEF细胞感染MDV或HVT后, 48~72小时, 当细胞出现CPE时, 收获盖玻片, 于PBS中洗一次, 然后于冷丙酮中固定2分钟, 置室温干燥。不同稀释度的鸡血清或McAb与已固定的细胞于37℃水浴箱中孵育30分钟后, 于PBS中洗10分钟, 再加上免抗鸡IgG或免抗小白鼠IgG异硫氰酸荧光素结合物 (工作浓度为1:20)。继续于37℃水浴箱中孵育30分钟, 再用PBS洗10分钟, 在标本上滴加50%甘油PBS, 用荧光显微镜检查。详细操作见Purchase⁽¹⁵⁾所叙述的方法。

六、酶联免疫吸附试验 (ELISA) 首先测定感染MDV或HVT细胞最佳反应的细胞数和抗血清的稀释度。试验用亲和层析提纯的山羊抗鸡或抗鼠IgG抗体过氧化物酶标记物 (Kirkegaard and Perrys Laboratories, Inc, Gaithersburg, Maryland), 预试结果表明, 最佳反应浓度为1:3200。ELISA的具体操作方法如下: 96孔圆底的微量ELISA

滴定板 (Immulon, Dynatech Laboratories, Inc, Alex, andxa, Virginia), 每孔加0.1毫升含有感染MDV或HVT细胞的pH7.2PBS包被, 然后加0.1毫升不同稀释度的鸡血清 (稀释液为3%牛血清白蛋白), 于37℃孵育1小时, 倒去试验标本后, 用0.1%吐温-80PBS (以下称洗液) 洗三次。每孔再加入0.1毫升的山羊抗鸡或抗鼠IgG抗体过氧化物酶标记物 (工作浓度1:3200), 于37℃再孵育1小时, 用洗液洗四次。每孔加入0.1毫升的底物 (一份0.05% H_2O_2 和九份提纯的5-水杨酸即每毫升0.02 MPBS含有一毫克5-水杨酸。置室温30分钟, 用MR590型微量ELISA光度计测定结果 (Dynatech Instruments, Santa Monia, California)。试验设阳性、阴性血清、单克隆抗体腹水、正常腹水、抗原以及空白等对照。

七、杂交瘤细胞的选育和单克隆抗体的制备 其具体方法按 Lee(11,24) 所报导的, 即BALB/c小鼠用MDV免疫后取脾细胞与小白鼠SP2/o或NS-1骨髓瘤细胞杂交融合, 用ELISA和IFA试验筛选MDV-McAb。

结 果

一、每孔最佳反应细胞数的测定 试验结果表明血清的滴度与抗原的浓度有关, 当所用的细胞数多时, 其血清和McAb的滴度亦高。但是, 如果细胞过多时, 其抗体滴度不但不会升高, 反而出现下降现象。所以必需测定最佳反应的抗原量 (细胞数)。我们选用1:400稀释的抗血清和每毫升含1000微克免疫球蛋白McAb对不同数量感染病毒的细胞进行试验, 结果见图1。抗体阴性血清和正常腹水与感染MDV细胞不发生反应, 抗体阳性血清和McAb

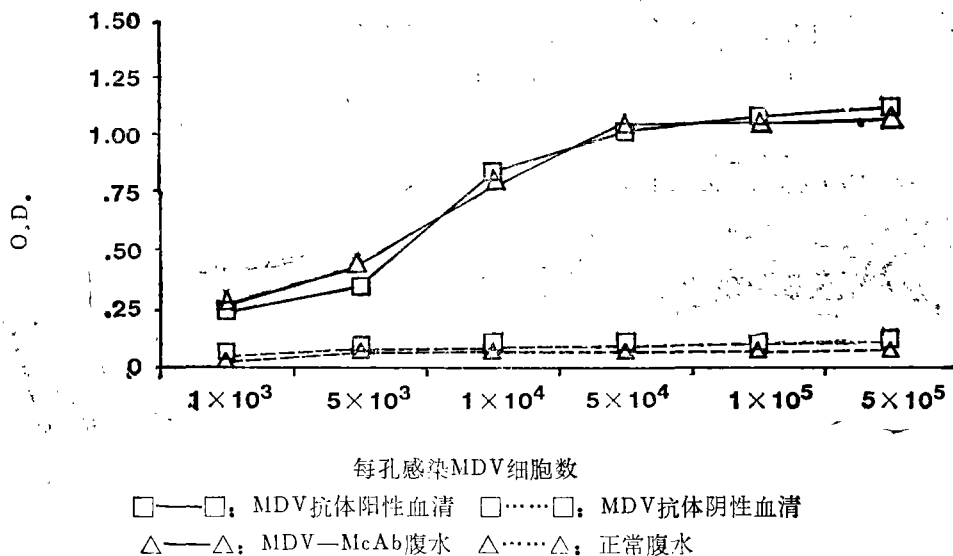
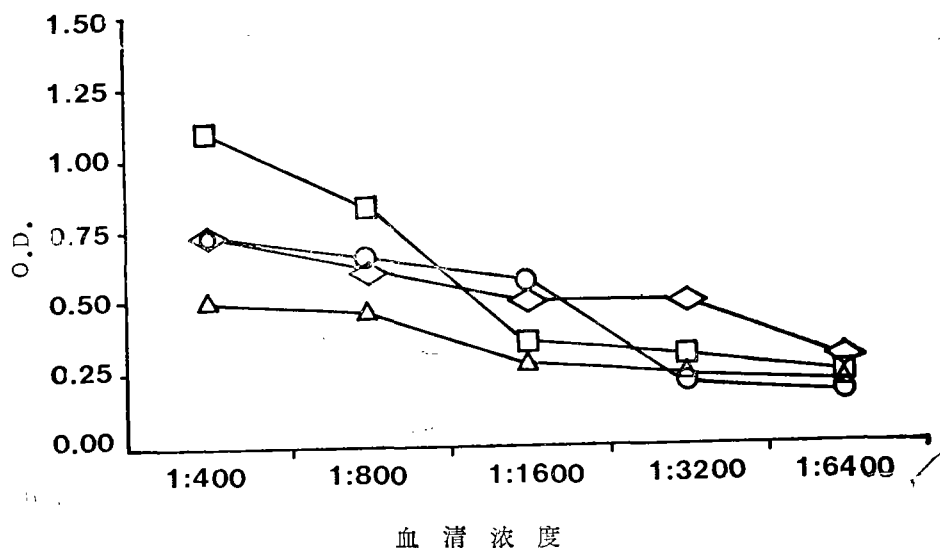


图1 ELISA试验用最佳全细胞抗原浓度

- MDV与感染MDV细胞发生特异性反应。其最佳反应的细胞数为 5×10^4 (大约含 1.7×10^8 PFU病毒)。

二、WcAg和PVAg敏感性、特异性比较 从感染MDV的CEF细胞中提取病毒,经20~40%连续蔗糖密度梯度离心,获得PVAg。未感染MDV的CEF细胞以同样的方法处理,所获得的物质为对照抗原,试验结果见图2(A)。抗体阳性血清和抗体阴性血清分别与PVAg和对照抗原均出现非特异性反应,当血清以1:400稀释时,PVAg与抗体阳性血清发生反应。但是,对照部份也出现反应。



□: MDV抗体阳性血清对PVAg ○: MDV抗体阳性血清与对照抗原
□: MDV阴性血清对PVAg △: MDV阴性血清与对照抗原

图2(A) ELISA试验用纯病毒抗原

试验用WcAg和未感染MDV的WcAg时,其抗体阳性血清与未感染MDV的WcAg或抗体阴性血清与WcAg和未感染MDV的WcAg不发生反应,其O.D值均低于0.2,抗体阳性血清与WcAg出现强特异性反应,详见图2(B)。

我们比较了WcAg和PVAg,结果是前者特异性反应强、非特异性反应弱。后者恰恰相反。

三、ELISA试验的敏感性和特异性 试验用85份血清分为三个组:第一组为25份MDV抗体阳性血清(感染MDV-JM株的10周龄鸡)。第二组为55份正常鸡血清(SPF白来克亨鸡)。第三组为其他病毒标准抗血清(ALV-、REV-、IBDV-、ADV-和REOV-标准阳性血清)。WcAg和未感染MDV的WcAg与以上鸡血清的ELISA试验结果见表1。25份MDV阳性血清与未感染MDV的WcAg不发生反应,而与WcAg则发生强特异性反应。血清以1:200和1:400稀释时,25份MDV抗体阳性血清的平均O.D.值分别为0.9

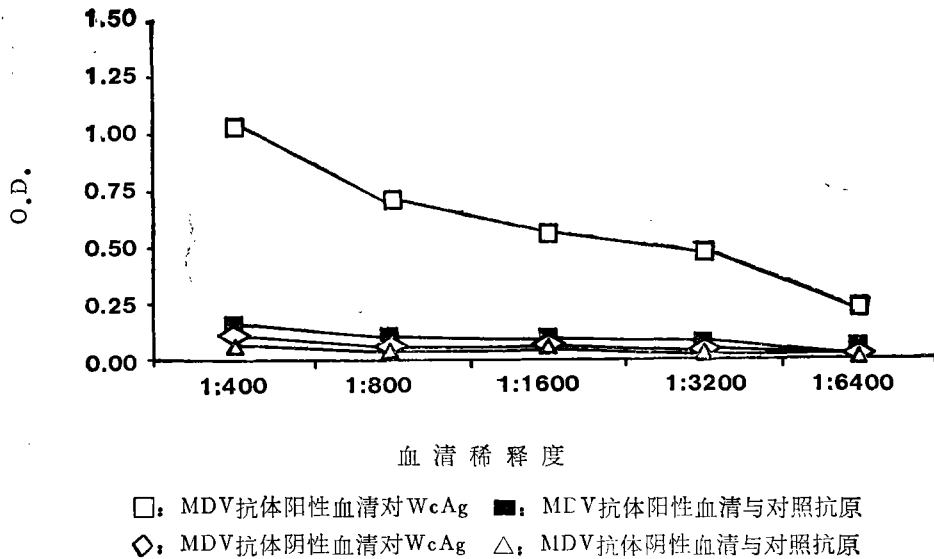


图 2 (B) ELISA试验用感染MDV的全细胞抗原

± 0.13 和 0.79 ± 0.17 , O.D值范围分别为 $0.75 \sim 1.08$ 和 $0.6 \sim 1.07$; 55份正常鸡血清的平均O.D值分别为 0.1 ± 0.07 和 0.05 ± 0.05 , O.D值范围分别为 $0.02 \sim 0.16$ 和 $0.01 \sim 0.12$; 5份其他病毒标准抗血清的平均O.D值分别为 0.14 ± 0.11 和 0.08 ± 0.06 , O.D值范围分别为 $0.03 \sim 0.18$ 和 $0.01 \sim 0.14$ 。这85份血清对未感染MDV的WcAg的ELISA结果是: 25份MDV抗体阳性血清, 1:200和1:400稀释时, 平均O.D值分别为 0.14 ± 0.02 和 0.04 ± 0.02 ; 55份正常鸡血清的平均O.D值分别为 0.06 ± 0.07 和 0.03 ± 0.02 ; 5份其他病毒标准抗血清的平均O.D值分别为 0.09 ± 0.07 和 0.06 ± 0.07 。说明ELISA试验敏感性高、特异性强。

表 1

酶联免疫吸附试验的敏感性和特异性^a

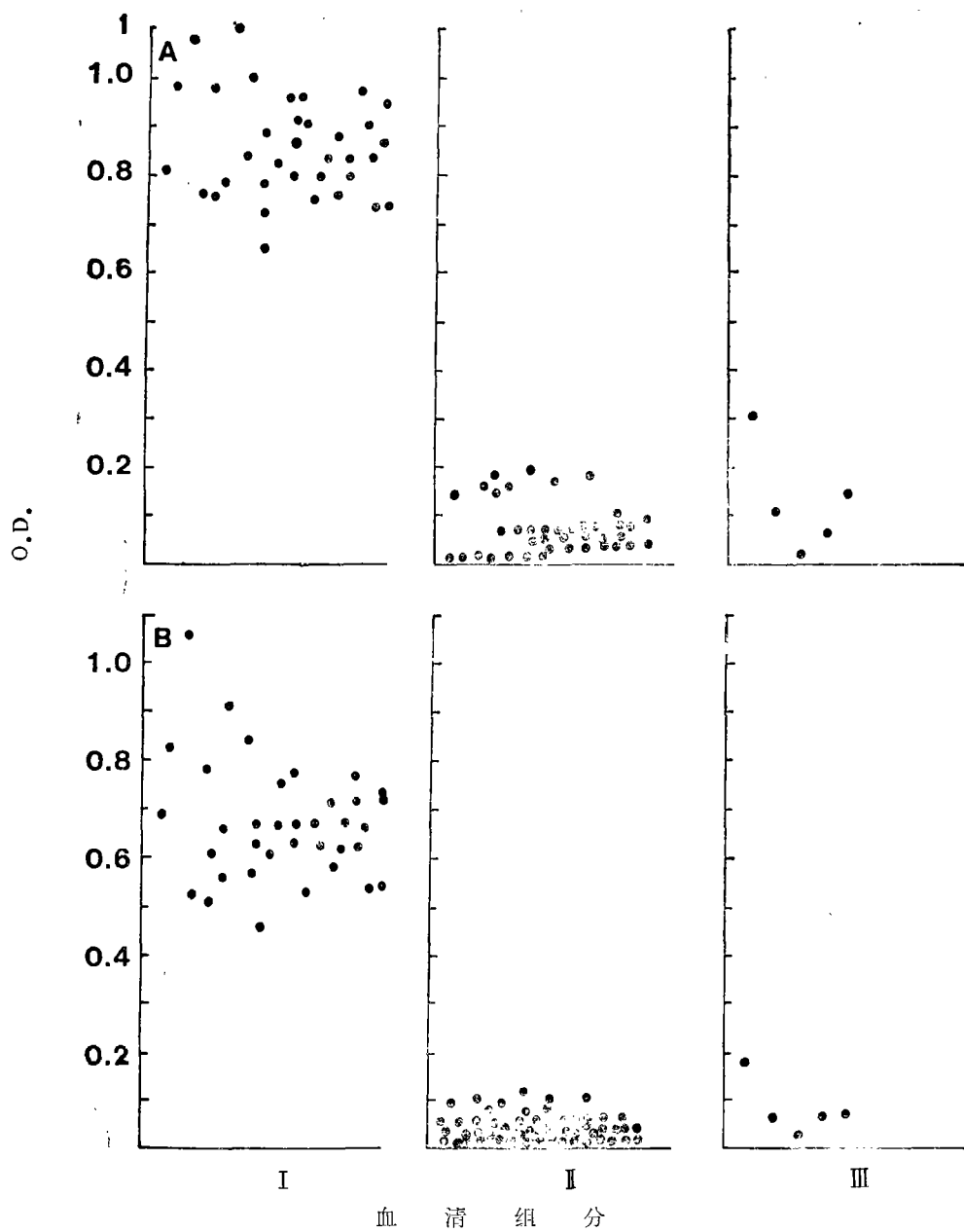
血清组分 ^b	抗体状况	试 验 血 清 数	感染MDV—CEF细胞		未感染MDV—CEF细胞	
			1:200 ^c	1:400	1:200	1:400
1	+d	25	0.92 ± 0.13	0.97 ± 0.17	0.14 ± 0.02	0.04 ± 0.02
2	-	55	0.10 ± 0.07	0.05 ± 0.05	0.06 ± 0.07	0.03 ± 0.02
3	-	5	0.14 ± 0.11	0.08 ± 0.06	0.09 ± 0.07	0.07 ± 0.07

a. ELISA试验方法如试验材料与方法所述, 每孔分别含感染MDV和未感染MDV的细胞数为 5×10^4 。

b. 第一组血清为MDV抗体阳性鸡血清; 第二组血清为正常鸡血清; 第三组血清分别为标准抗-ALV、-IBDV、-REV、-ADV血清。

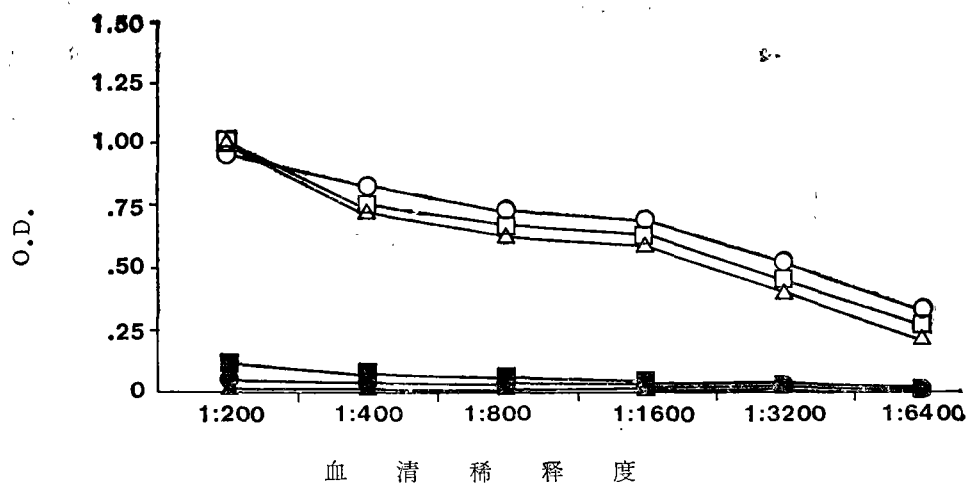
c. 鸡血清稀释度。

d. IFA试验证实为MDV阳性血清。



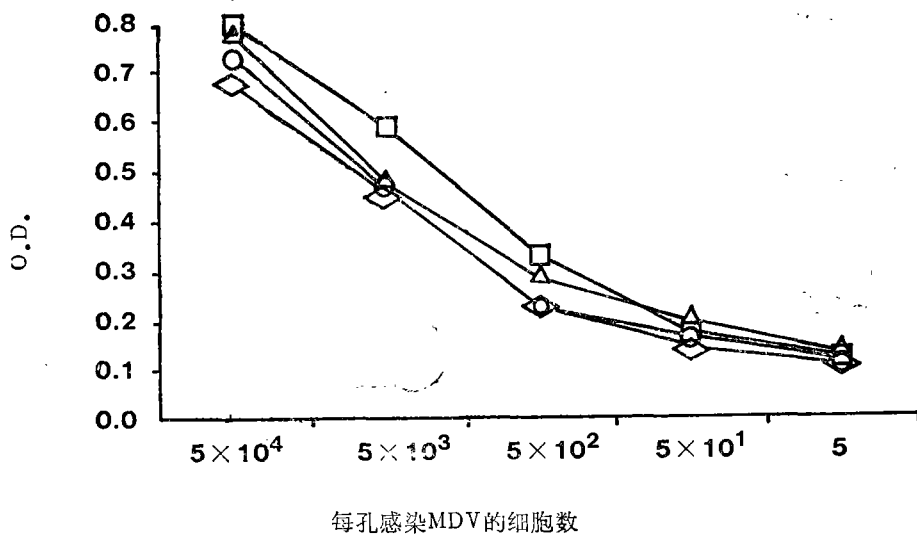
A: 1:200稀释的血清; B: 1:400稀释的血清。I组为AGP试验阳性的试验感染MDV的鸡血清;
II组为SPF鸡血清; III组为其他病鸡标准抗血清。

图3 ELISA试验单份血清的分布



○: 抗原包被后对MDV抗体阳性血清; ●: 抗原包被后对MDV抗体阴性血清; □: 抗原包被后保存于-20℃三个月对MDV抗体阳性血清; ■: 抗原包被后保存于-20℃三个月对MDV抗体阴性血清; △: 抗原包被后保存于4℃三个月对MDV抗体阳性血清; ▲: 抗原包被后保存于4℃三个月对MDV抗体阴性血清。

图4 全细胞抗原的稳定性试验。ELISA微量滴定板孔包被感染MDV全细胞抗原后保存于4℃和-20℃



□: 当天; △: 第三天; ◇: 第七天; ○: 第十天。

图5 ELISA试验的重复性。WcAg于4℃不同时间对同份MDV阳性血清的滴度

根据以上试验结果,当血清以1:400稀释时,其O.D.值为0.2即为抗体阳性血清。因为抗体阴性血清的O.D.值仅0.05,再加上三个标准差的和为0.2。所以,我们选定O.D.值0.2为抗体阳性血清。每份血清的O.D.值分布见图3。

四、WcAg的稳定性试验 为测定保存WcAg的最佳温度,把已包被WcAg和未感染MDV的WcAg的ELISA微量滴定板孔,保存于4℃和-20℃。分别于一、二、三个月测定其特异性反应,结果未见抗原滴度降低。详见图4。

五、ELISA试验的重复性 我们把包被WcAg的ELISA微量滴定板孔置4℃,分别于第1(当天)、3、7、10天,用同份已稀释的抗体阳性血清测定抗原的滴度。4次试验结果抗原滴度非常接近,说明ELISA试验结果可靠,重复性高。见图5。

六、ELISA和IFA试验的敏感性和特异性比较 试验用18份鸡血清,其中包括3个不同血清型MDV毒株免疫感染的鸡血清和正常鸡血清。每份血清分别与3个不同血清型病毒作ELISA和IF试验。试验用的抗原量为每孔 5×10^4 细胞。结果见表2,从表2看出ELISA和IF试验结果完全一致,即MDV抗体阳性血清ELISA和IF均阳性,而MDV抗体阴性血清ELISA和IF均阴性。所不同的是ELISA的敏感性比IF高20~40倍。同时,抗血清对同型病毒的滴度比异型病毒的滴度高8~16倍。

七、ELISA和IFA试验筛选杂交瘤细胞 用ELISA和IFA试验对四次融合的976孔杂交瘤细胞进行了筛选。结果表明,ELISA检出率比IFA高。但是,不显著。两者之间的符合率85%(见表3)。说明ELISA试验不仅可以代替IFA试验筛选杂交瘤细胞,而且简便、经济,适合于大量筛选杂交瘤工作。同时,我们应用ELISA和IFA试验,可以把McAb-MDV分为三种类型:既有ELISA特性,又有IFA特性的McAb(2BN₂₀、4BS₁₀和4CN₈);只有ELISA特性,而不具备IFA特性的McAb(2BN₆、2BN₂₁和4CN₅);只有IFA特性,而无ELISA特性的McAb(H₁₀、T₈₁和Y₅)。

讨 论

作为一种免疫学试验用的ELISA方法,其特异性、敏感性和可靠性取决于所用试剂和操作方法的标准化。检测MDV抗体的ELISA试验也不例外,首先必须测定各种试剂和反应的最佳条件。

通常ELISA试验需要用纯的抗原,由于MDV与宿主细胞紧密结合的特性,用常规提纯病毒抗原的方法提取纯的MDV抗原难度大,产量低,非特异性反应高。我们发现用WcAg不但敏感性高、特异性强,而且抗原制备简便、稳定。适用于定性、定量检测MDV抗体。同份血清标本经多次重复试验,结果非常一致,说明该试验方法的可靠性和重复性好。每批的抗原在正式试验前均要测定其最佳反应量,因为不同批的病毒其滴度亦不同。通常每孔最佳反应的细胞数为 5×10^4 ,大约含 1.7×10^3 PFU病毒。

多数人报导^[19,20,21]禽血清对塑料板有非特异性吸附作用,我们同样观察到这种现象。当血清1:200、1:400稀时,抗体阳性血清一般产生很高的O.D.值,而当血清以1:400时,抗体阴性血清其O.D.值显著地减少(减少50%以上)。所以,我们采用1:400

表 2 酶联免疫吸附试验和免疫荧光试验的敏感性与特异性比较^a

血清数	病毒血清型	病毒株	血清 I 型		血清 II 型		血清 III 型	
			(MD11/750株)		(SB—1 株)		(FCI—26株)	
			ELISA	IFA	ELISA	IFA	ELISA	IFA
3	1	JM	3200 ^c	176 ^c	480	36	790	32
3	2	SB-1	667	60	533	267	533	27
5	3	FC126	960	44	560	28	6400	192
2	1,3	JM, FC126	3200	160	800	20	3200	160
2	1,2,3	JM, SB-1, FC126	1600	160	1600	80	3200	80
3	none	uninfected	<200	<20	<200	<20	<200	<20

a. ELISA和IFA试验条件按试验材料和方法所叙。

b. MDV阳性血清获自试验感染MDV的鸡；阴性血清取自未感染MDV的SPF鸡。

c. ELISA和IFA的滴度为组的平均数。

表 3 ELISA和IFA试验筛选单克隆抗体的敏感性比较^a

方 法		I F A		合 计
		+	-	
ELISA	+	251	86	337
	-	59	580	639
合 计		310	666	976

^a $\chi^2 = 1.7$ $P > 0.05$

稀释的血清检测特异性抗体。

阳性血清的判定标准是根据血清稀释度的O.D.值。选判定标准时,要权衡反应的特异性和敏感性,如果选用O.D.值界限偏低时,会增加假阳性。相反,如果选用O.D.值界限偏高时,就会出现假阴性。我们认为正常鸡血清以1:400稀释时,其O.D.值均低于0.05。所以,选用抗体阴性血清的平均O.D.值加上三个标准差的和为判定标准。这是否比较客观有待进一步探讨。

我们比较了ELISA和IF试验的敏感性和特异性,结果表明ELISA比IF试验的敏感性高20~40倍。试验血清对同型病毒抗原的滴度比对异型病毒抗原的滴度高8~16倍。ELISA和IF试验筛选MDV—McAb,两者之间的符合率达85%。

为了大批量筛选MDV—McAb和检测鸡血清中MDV抗体(尤其是母原抗体),我们成功地利用了MDV与细胞紧密结合的特性,选用WcAg建立了检测MDV抗体的ELISA试验,其敏感性高、特异性强、经济、简便,为研究MD提供了有效的工具。

参 考 文 献

- [1] Adam, A., 1973. Concentration of Epstein-Barr virus from cell culture fluids with polyethylene glycol. *J. Gen. Virol.* 20: 391~394.
- [2] Calnek, B.W., W.R. Shek, N.A. Menendez, and P. Stiube, 1982. Serological cross-reactivity of avian adenovirus serotypes in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Dis.* 26: 897~906.
- [3] Chubb, R.C., and A.E. Churchill, 1968. Precipitating antibodies associated with Marek's disease. *Vet Rec.* 83: 4~7.
- [4] Churchill, A.E., and P.M. Biggs, 1967. Agent of Marek's disease in tissue culture. *Nature* 215: 528~530.
- [5] Davson, G.J., L. N. Orsi, V. J. Yates, P.W. Chang, and A. D. Pronovost, 1980. An enzyme linked immunosorbent assay for detection of antibodies to avian adenovirus and avian adenovirus associated virus in chickens. *Avian Dis.* 24: 393~402.
- [6] Garcia, Z., and R.A. Bankowski, 1981. Comparison of a tissue culture virus neutralization test and the enzyme linked immunosorbent assay for measurement of antibodies to infectious bronchitis. *Avian Dis.* 25: 121~130.
- [7] Herling, A., C. Monreal, and V. von Bulow, 1981. Standardization of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting antibodies to avian infectious bronchitis virus. *Zbl. Vet. Med.* B, 28: 693~703.
- [8] Howie, R., and J. Thorsen, 1981. An enzyme-linked immunosorbent assay for infectious bursal disease virus. *Can. J. Comp. Med.* 45: 51~55.
- [9] Lee, L.F., 1971. Large-scale production of Marek's disease virus. *Avian Dis.* 15: 565~571.
- [10] Lee, L.F., E.D. Kieff, S.L. Pachenheimer, B. Roizman, P.G. Spear, B.R. Burmester, and K. Nazarian, 1971. Size and composition of Marek's disease virus deoxyribonucleic acid. *J. Virol.* 7: 289~294, 1971.
- [11] Lee, L. F., Xiufan Liu, and R.L. Witter, 1983. Monoclonal antibodies with specificity for three different serotypes of Marek's disease virus in chickens. *J. Immunol.* 130: 1003~1006.
- [12] Marquardt, W. W., D. B. Snyder, and B. A. Schlotthober, 1981. Detection and quantification of antibodies of infectious bronchitis virus by enzyme linked immunosorbent assay. *Avian Dis.* 25: 713~722.
- [13] Mockett, A. P. A., and J. H. Darbyshire, 1981. Comparative studies with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* 10: 1~10.
- [14] Nazarian, K., J. J. Solomon, R. L. Witter, and B.R. Burmester, 1968. Studies on the etiology of Marek's disease. II. Finling of a herpes virus in cell culture. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 127: 177~182.
- [15] Purchase H. G. Immunofluorescence in the study of Marek's disease. 1961. Detection of antigen in cell culture and an antigenic comparison of eight isolates. *J. Virol.* 3: 557~565.

- [16] Schat, K. A., and B. W. Calnek. 1978. Characterization of an apparently nononcogenic Marek's disease virus. *J. Natl. Cancer Inst.* 60: 1075~1082.
- [17] Sharma, J. M. 1977. Cell-mediated immunity to tumor antigen in Marek's disease: susceptibility of effector cells to anti-thymocyte serum and enhancement of cytotoxic activity by vibrio cholerae neuraminidase. *Infect. and Immunol.* 18: 46~51.
- [18] Silim, A., and J. Thorsen. 1981. Hemorrhagic enteritis: Virus distribution and sequential development of antibody in turkeys. *Avian Dis.* 25: 444~453.
- [19] Slaght, S. S., T. J. Yang, L. van der Heide, and T. N. Fredrickson. 1978. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting chicken anti-reovirus antibody at high sensitivity. *Avian Dis.* 22: 802~805.
- [20] Slaght, S. S., T. J. Yang, and L. van der Heide. 1979. Adaptation of enzyme-linked immunosorbent assay to the avian system. *J. Clin. Microbiol.* 10: 698~702.
- [21] Smith, E. J., and R. L. Witter. 1983. Detection of antibodies against reticuloendotheliosis viruses by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Dis.* 27: 225~234.
- [22] Witter, R. L., K. Nazerian, H. G. Purchase, and G. H. Burgoyne. 1970. Isolation from turkeys of a cell-associated herpesvirus antigenically related to Marek's disease virus. *Am. J. Vet. Res.* 31: 525~538.
- [23] Witter, R. L., J. M. Sharma, and A. M. Fadly. 1980. Pathogenicity of variant Marek's disease virus isolants in vaccinated and unvaccinated chickens. *Avian Dis.* 24: 210~232.
- [24] 程由铨和Lucy F. Lee, 1985, 马立克氏病毒单克隆抗体的研究. *中国病毒学报* 1(2): 141~146.

AN ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY FOR THE DETECTION OF ANTIBODIES TO MAREK'S DISEASE VIRUS

Cheng Youqnan

*(Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine,
Fujian Academy of Agriculture Sciences)*

L.F.Lee, E.J.Smith, and R.L.Witter

*(U.S.Department of Agriculture, Agricultural Research Service,
Regional Poultry Research Laboratory)*

ABSTRACT

A reproducible enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using Marek's disease virus (MDV)-infected cells for the detection of antibodies to MDV is described. The optimum number of MDV-infected chicken embryo fibroblasts (CEF) was 5×10^4 /well, and test sera were positive at 1:400 dilutions. Compared with a purified virus preparation, MDV-infected CEF produced high specific and low nonspecific reactivities. Wells coated with whole cells could be stored at 4 °C or -20 °C for at least 3 months without loss of reactivity. With antibody-negative sera, the cutoff absorbancy was 0.20 units. The ELISA was 20-to-40-fold more sensitive than indirect immunofluorescence. Homologous combinations of antisera in wells coated with CEF infected with different MDV serotypes were more reactive at higher dilutions than that were heterologous combinations. The procedure described is specific and suitable for large-scale screening of both chicken and monoclonal antibodies against MDV.