

鳗弧菌和溶藻弧菌二联疫苗对大菱鲆的免疫效果

曹宏梅^{1,2}, 李 健², 战文斌¹

(1. 中国海洋大学 生命科学与技术学部, 山东 青岛 266003; 2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 山东 青岛 266071)

摘要:将鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)和溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)分别用 0.3% 福尔马林灭活, 制备成鳗弧菌和溶藻弧菌 2 种单苗, 并将 2 种菌等量配制制成二联疫苗, 单次腹腔注射免疫大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)。通过检测免疫后替代途径补体活力、溶菌酶活力、抗体凝集效价的变化并分别进行攻毒实验比较疫苗的免疫效果。结果显示, 3 种疫苗对所测定的各免疫指标都有一定的促进作用, 但二联疫苗后期效果低于 2 种单苗。二联疫苗对鳗弧菌和溶藻弧菌的免疫保护率分别为 83.52% 和 83.24%, 而鳗弧菌单苗对鳗弧菌攻毒、溶藻弧菌单苗对溶藻弧菌攻毒的免疫保护率分别为 80.37% 和 74.89%。可以认为 2 种菌具有制备二联疫苗的可能性。[中国水产科学, 2006, 13(3): 397-402]

关键词:大菱鲆; 二联疫苗; 鳗弧菌; 溶藻弧菌

中图分类号:S941 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2006)03-0397-06

鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)能引起世界范围内的 50 多种海水淡水养殖鱼类及其他养殖动物发生弧菌病^[1], 是海水鲆、鲷鱼类的主要病害。其病症为快速的暴发性败血症及组织损伤, 病鱼常常在 2~3 天内大量死亡。大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)对鳗弧菌尤其敏感^[2]。溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)也是海水养殖动物的常见致病菌, 姚志刚等^[3]报道, 溶藻弧菌是大菱鲆育苗期间主要的致病菌。

长期以来, 药物防治细菌病带来的多重耐药性、药物残留和在环境中的扩散已经引起了食品安全和环境公共卫生方面的严重问题, 使用疫苗势在必行。在国外, 杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)、弧菌(*Vibrio* sp.)、耶尔森氏菌(*Yersinia* sp.)等多种鱼类致病菌的疫苗已商品化。在国内, 鱼用疫苗的研究虽取得一定成功, 但以单价苗居多, 多联疫苗少见, 非特异性免疫和作用机理探索过少。

鉴于鳗弧菌和溶藻弧菌是大菱鲆的常见致病菌, 且国际上已有鳗弧菌与其他弧菌联合成功制备疫苗的先例, 本研究参考兽用联合疫苗的制备流程, 针对此 2 种菌联合制备疫苗的可能性进行探索, 从特异、非特异免疫两方面综合评价其保护效果, 旨在

预防大菱鲆暴发性细菌病的相关疫苗制备提供基础依据。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼

实验在中国水产科学院黄海水产研究所青岛实验基地进行, 健康大菱鲆体质量(31.2 ± 1.9) g, 水温(18 ± 2) °C, 免疫接种前驯养 1 周。

1.2 疫苗

鳗弧菌、溶藻弧菌分别由中国海洋大学生命科学与技术学部和中国科学院微生物研究所提供。2 种菌分别用 2216E 液体培养基培养 20 h, 离心收集菌体, 用 PBS(pH 7.2)悬浮, 0.3% (v/v) 福尔马林灭活, 4 °C 过夜, 并作灭活检验和安全性检验。免疫接种前, 用灭菌 PBS(pH 7.2)洗涤 2 次, 以去除福尔马林, 制成 10^9 CFU/mL 的 2 种单价疫苗。二联疫苗含等量的鳗弧菌和溶藻弧菌, 总浓度为 2×10^9 CFU/mL。

1.3 免疫及采血

实验用鱼随机分为 4 组, 单苗组各 30 尾, 对照组及二联疫苗组各 60 尾。腹腔注射免疫 0.2 mL, 对照组注射灭菌 PBS(pH 7.2)。免疫接种后, 每隔

收稿日期: 2005-09-28; 修订日期: 2005-11-28。

基金项目: 科技部社会公益研究专项(2004DIB4J165); 山东省科技发展计划项目(2003-4-1)。

作者简介: 曹宏梅(1982-), 女, 在读硕士生, 主要从事鱼用疫苗研究。E-mail: chen_mbc@163.com

通讯作者: 李 健。E-mail: lijian@ysfri.ac.cn

7天从各组随机取15尾鱼,尾静脉取血,每尾0.2 mL,于4℃静置3~5 h,离心收集血清,分装,-20℃贮存备用。

1.4 免疫指标的测定

1.4.1 替代途径补体活力 血清中替代途径补体活力(ACH50)参考 Yano^[4]的方法测定。将100 μL兔红细胞(RaRBC)悬液($2 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$)加到100 μL用EGTA-Mg²⁺-GVB缓冲溶液稀释的系列鱼血清中,不断摇动;28℃反应1 h,冰水浴终止反应,然后1 500 r/min离心5 min。血清的溶血程度通过酶标仪在540 nm测定上清液的吸光值来表示。活力单位定义为使RaRBC发生50%溶解的血清量。

1.4.2 溶菌活力 血清中溶菌酶活力通过浊度比色法测定^[5]。反应底物为用PBS(pH 6.1)配制的0.2 mg/mL微壁溶球菌(Sigma)悬液。100 μL血清与1 900 μL菌悬液混合,在530 nm波长下,分别在0.5 min和4.5 min测定吸光值(OD)。每min吸光值减少0.001为1个活力单位。

1.4.3 抗体效价的测定 按照微量凝集法^[6]并适当改进。U字底96孔板每孔先加50 μL PBS(pH 7.2),每行第1孔再加各组待测血清50 μL,并作2倍序列稀释,同时设阴性及阳性对照。最后每孔加50 μL对应接种的单价疫苗或二联疫苗作为抗原,混匀加盖,28℃孵育18 h。能与抗原发生明显凝集反应的血清最高稀释倍数,即为该免疫血清的效价。为便于比较,以效价的log₂值表示。

1.5 攻毒实验

对照组及联苗组采用2种菌分别攻毒,每组再

平均分为4个小组,每2个小组用同一种菌攻毒,计算平均死亡率。各单苗组也平均分为2个小组,用相应的菌攻毒,同时计算平均死亡率。攻毒前将菌株在大菱鲂体内传代3次,经预实验确定鳃弧菌、溶藻弧菌攻毒浓度分别为 10^8 mL^{-1} 和 $2 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$,注射剂量0.2 mL/尾,记录攻毒后14 d内各组的累计死亡,并计算相对免疫保护率(Relative Percent Survival, RPS):

$$\text{RPS} = (1 - \frac{M_1}{M_c}) \times 100\%$$

式中, M_1 为免疫组死亡率, M_c 为对照组死亡率。

1.6 统计分析

利用统计软件SPSS 11.0对实验结果进行单因素方差分析(One-way ANOVA),免疫指标以 $\bar{X} \pm \text{SD}(n=5)$ 计。

2 结果

2.1 替代途径补体活力

如图1所示,从免疫的第2周开始,各免疫组的ACH50较对照组有较大提高,各实验组分别于第3周达到峰值,之后开始不同程度的下降,其中二联疫苗的补体活力下降最为迅速,并于第4、5周显著低于溶藻弧菌疫苗组($P < 0.05$)。2个单苗组除第5周外无显著性差异($P > 0.05$)。实验期间溶藻弧菌疫苗组的ACH50一直显著高于对照组($P < 0.05$)。结果显示,溶藻弧菌疫苗促进ACH50的效果最为明显,二联疫苗效果相对较弱。

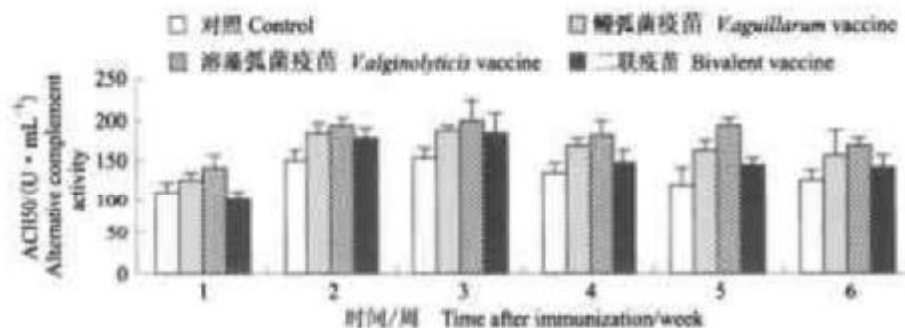


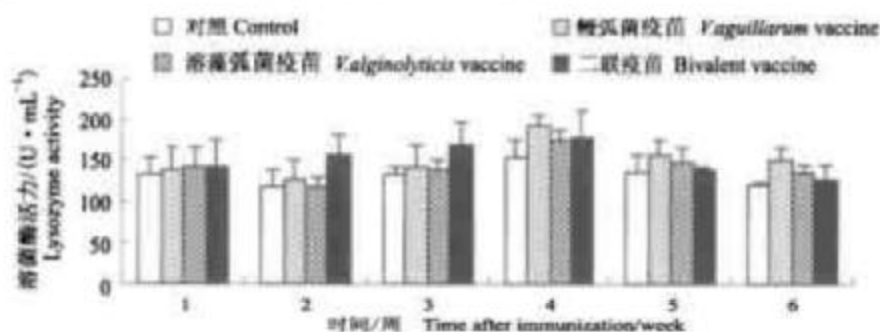
图1 免疫后不同时间的替代途径补体活力(ACH50)的比较($n=5$)

Fig.1 Comparison of alternative complement activity (ACH50) at different time after immunization($n=5$)

2.2 溶菌活力

图2表明,接种免疫后二联疫苗的溶菌活力不同程度的高于对照组,于第3周达到显著性差异($P < 0.05$)。从第4周开始,2个单苗组的溶菌活力开始高于对照组,第5、6周又均高于二联疫苗,鳃弧菌

疫苗的活力于第6周显著高于二联疫苗组和对照组($P < 0.05$)。结果表明,接种疫苗对大菱鲆的溶菌活力有一定的促进作用,其中在实验前期二联疫苗效果较2个单苗组明显,在实验后期鳃弧菌疫苗的作用相对明显。



2.3 抗体效价

图3显示,免疫后1周就可以检测到抗体。鳃弧菌疫苗、二联疫苗平均抗体效价于第3周达到峰值分别为 $2^{5.75}$ 和 $2^{6.25}$,溶藻弧菌疫苗于第4周达到峰值 $2^{4.5}$,达到峰值后陆续开始下降,但鳃弧菌疫苗组的效价下降缓慢。在同期测定时鳃弧菌疫苗所激起的抗体效价等于或高于溶藻弧菌疫苗的效价,于第3、5周达到显著差异($P < 0.05$)。二联疫苗的抗

体效价于第2周显著高于鳃弧菌疫苗($P < 0.05$),第5、6周显著低于鳃弧菌疫苗($P < 0.05$);于第2、3周显著高于溶藻弧菌疫苗($P < 0.05$),第5、6周低于溶藻弧菌疫苗组,但未形成显著差异($P > 0.05$)。对照组从第4周开始检测到了抗体,但效价一直较低。结果表明,鳃弧菌疫苗激起的抗体效价高而持久,免疫原性优于溶藻弧菌疫苗,二联疫苗的抗体效价波动较大。

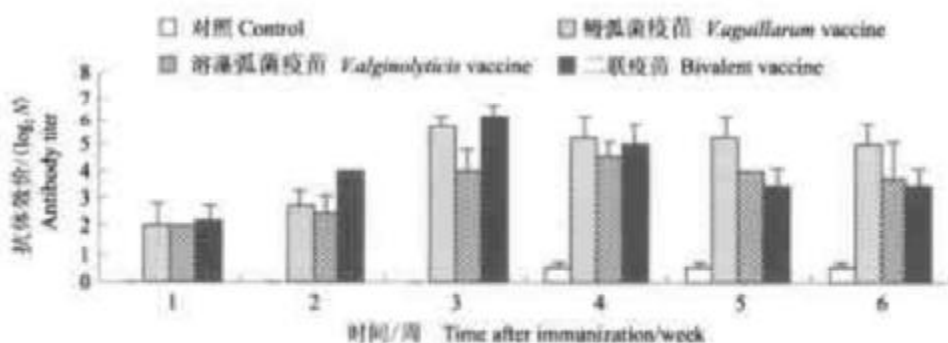


图3 免疫后不同时间抗体的比较($n = 5$)

Fig.3 Comparison of antibody titer at different time after immunization($n = 5$)

2.4 攻毒实验

人工攻毒鳃弧菌之后,对照组对鳃弧菌较敏感,攻毒后第3天,累积死亡率高达 $(90 \pm 7.07)\%$ (表1)。鳃弧菌疫苗组及二联疫苗组表现了明显的免疫保护作用,免疫保护率分别为80.37%、83.52%。免疫组与对照组形成显著差异($P < 0.05$),鳃弧菌疫苗组与二联疫苗组未形成显著性差异($P > 0.05$)。

如表1所示,人工攻毒溶藻弧菌后,对照组累积死亡率达到了 $(55 \pm 12.72)\%$,溶藻弧菌疫苗组和二联疫苗组分别从第4、6天开始死亡,死亡时间延迟,免疫保护率分别为74.89%和83.24%,都表现了一定的免疫保护效果。免疫组与对照组形成显著差异($P < 0.05$),溶藻弧菌疫苗组与二联疫苗组未形成显著性差异($P > 0.05$)。

表1 鳃弧菌、溶藻弧菌分别攻毒后的累计死亡率

Tab.1 Cumulative mortality after challenge with *V. anguillarum* and *V. alginolyticus* respectively $\bar{X} \pm SD, n=5$

组别 Group	鳃弧菌攻毒/% <i>V. anguillarum</i> challenge	溶藻弧菌攻毒/% <i>V. alginolyticus</i> challenge
对照 Control	90.00 $\pm$ 7.07 ^b	55.00 $\pm$ 12.72 ^b
鳃弧菌疫苗 <i>V. anguillarum</i> vaccine	17.67 $\pm$ 4.78 ^a	—
溶藻弧菌疫苗 <i>V. alginolyticus</i> vaccine	—	13.81 $\pm$ 0.67 ^a
二联疫苗 Bivalent vaccine	14.84 $\pm$ 7.77 ^a	9.22 $\pm$ 1.41 ^a

注:表中各列不同字母表示各组差异显著($P < 0.05$)。Note: Treatments mean with the different letter in the same line are significantly different from each other ($P < 0.05$).

3 讨论

非特异免疫系统在抵御病原菌入侵时首先发挥作用并且作用广泛。特异性免疫作用于特定病原体,范围狭窄,激起缓慢,但却持久^[7],所以本实验在研究疫苗的免疫效果时同时考虑了这两方面。

Yano 等^[8]证实,鲑科 (Salmonidae)、鲤科 (Cyprinidae) 等养殖鱼类的补体旁路途径(替代途径)的活性比哺乳动物的高出 5~60 倍。硬骨鱼类补体因子可以通过多糖(如脂多糖)来激活,脂多糖(LPS)又是大多数 G⁻ 菌细胞壁的主要成分之一,而鳃弧菌和溶藻弧菌都是 G⁻ 菌,所以推测所制备的疫苗可以激起大菱鲆的 ACH50。本实验结果证实,免疫接种后各免疫组大菱鲆都提高了替代途径补体活力。Yano 等^[9]证实,鲤鱼 (*Cyprinus carpio* L.) 经注射某些多糖可激活补体系统。但 Kusuda 等^[10]证实,用减毒类结缔组织疫苗免疫五条鲷 (*Seriola quinqueradiata*) 不影响其补体的溶血活性。

溶菌酶是鱼类非特异性免疫系统的重要组成部分。接种免疫后,巨噬细胞可通过吞噬作用和胞饮摄取抗原,安利国等^[11]推测由于吞噬活性增加后,巨噬细胞合成和释放出了更多的溶菌酶。本结果显示,接种疫苗后各实验组溶菌酶活性有不同程度的提高。已经发现欧洲白鲑 (*Coregonus lavaretus* L.)^[12]和其他鲑类^[13-15]经过刺激后溶菌酶活力增强。已经证实免疫后溶菌酶活力的激起依赖抗原的类型和使用的佐剂^[14,16]。

抗体是脊椎动物在对抗原刺激的免疫应答中,由淋巴细胞产生的一类能与相应抗原特异性结合的具有免疫功能的球蛋白。在本实验的第1周就检测到了抗体,在实验的第3、4周陆续达到最大值。高

冬梅等^[17]报道,腹腔注射免疫牙鲆的抗体效价最大值出现于 40 d 左右,其他微量凝集方法检测的平均抗体效价略高于本次结果,分别为 2^{8.25}、2^{10.56}^[18-19]。除种间差别、环境因素、接种方式和鱼体的生理状态造成的差异外,本实验结果偏低的主要原因可能有:(1)单次免疫,未经加强免疫;(2)未添加任何佐剂;(3)疫苗所激起的免疫反应主要是细胞免疫。

本实验通过分别攻毒显示二联疫苗对鳃弧菌和溶藻弧菌的免疫保护高于 2 个单苗组单独作用。类似的报道有:Midtlyng 使用杀鲑气单胞菌、鳃弧菌 O1、O2 和杀鲑弧菌 (*V. salmonicida*) 联合疫苗免疫大西洋鲑 (*Salmo salar* L.), 通过攻毒试验证实其保护率高于杀鲑气单胞菌单价疫苗^[20]。哈氏弧菌 (*V. harveyi*) 和巴斯德杆菌 (*Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida*) 二联疫苗浸泡免疫 *Solea senegalensis* 的效果与各单苗组注射免疫效果相当^[21]。尽管在实验后期二联疫苗的抗体效价不及 2 个单苗组的高,但很多研究结果表明,受免鱼类的抗体水平高低与免疫保护力往往并不完全相关。Michel 等^[22]发现,经接种后平均凝集抗体效价分别达到 1 706 和 40 的虹鳟对疥病有相同的保护力。这些结果说明,仅依靠检测抗体效价是难以准确判断受免鱼免疫保护力的强弱,可能由于在抵御病原菌时细胞免疫较体液免疫发挥更大作用或者所检测到的抗体并不完全是保护性抗体。

在测定溶菌酶活力和抗体效价时发现,二联疫苗的效果在实验初期都表现得好于单苗,可能因为在实验初期二联疫苗的浓度是单苗的一倍,有更多的灭活的菌细胞刺激机体产生免疫反应,但实验后期两指标下降幅度较大,都低于 2 种单苗,其机理尚

需深入研究。二联疫苗的免疫保护率稍高于两单苗的,推测可能由于免疫交叉反应造成的,有待进一步证实。制备联合疫苗时可能发生抗原竞争,但相关报道较少,只有 Fahey^[23]报道抗原竞争容易发生在同种细菌不同血清型之间。而 Amend^[24]证实用鳃弧菌、鲁氏耶尔森菌(*Yersinia ruckeri*)、杀鲑气单胞菌、鲑肾杆菌(*Renibacterium salmoninarum*)联合免疫鲑鱼时没有发生抗原竞争现象,4种菌联合使用具有可能性。

本研究发现溶菌酶活力及补体旁路途径可能受到2种抗原同时免疫的影响。但免疫保护率是检验疫苗有效性的最有说服力的指标,从这个角度来讲鳃弧菌和溶藻弧菌二联疫苗是可行的。

参考文献:

- [1] Egidius E. Vibrinosis: Pathogenicity and pathology. A review [J]. *Aquaculture*, 1987, 67: 15-28.
- [2] Beichnell I R, Bowden T J, Verner-Jeffreys D W, et al. Susceptibility of juvenile and sub-adult Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) to infection by *Vibrio anguillarum* and efficacy of protection induced by vaccination [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2000, 10(4): 319-327.
- [3] 姚志刚, 天 宝. 大菱鲶育苗期的细菌病研究 [J]. *海洋科学*, 2004, 28(9): 10-12.
- [4] Yano T. Assays of hemolytic complement activity [A]. In: J S Stolen, T C Fletcher, D P Anderson, S L Kaattari and A F Rowley (Eds). In *Techniques in Fish Immunol* [C]. New Jersey: Fair Haven. SCOS Publications, 1992. 131-141.
- [5] Ellis A E. Lysosome assays [A]. *Techniques in Fish Immunol* [C]. New Jersey: Fair Haven. SCOS Publications, 1990. 101-103.
- [6] Klesius P H, Shoemaker C A, Evans J J. Efficacy of single and combined *Streptococcus iniae* isolate vaccine administered by intraperitoneal and intramuscular routes in tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Aquaculture*, 2000, 188: 237-246.
- [7] Anderson D P. Immunostimulants, adjuvants and vaccine carrier in fish: application to aquaculture [J]. *Annual Review of Fish Dis*, 1992, 2: 281-307.
- [8] Yano T, Hatayama T, Matsuyama H, et al. Titration of the alternative complement pathway activity of representative cultured fishes [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1988, 54: 1049-1054.
- [9] Yano T, Matsuyama H, Mangindan R E P. Polysaccharide-induced protection of carp, *Cyprinus carpio* L., against bacterial infection [J]. *J Fish Dis*, 1991, 14: 577-582.
- [10] Kusuda R, Hamaguchi M. The efficacy of attenuated live bacterin of *Pasteurella piscicida* against pseudotuberculosis in yellowtail [J]. *Bull Eur Ass Fish Pathol*, 1988, 8: 51-53.
- [11] 安利国, 冯程强, 那维贤, 等. 灭活疫苗对鲢鱼血清溶菌酶和腹腔吞噬细胞活性的作用 [J]. *山东师范大学学报(自然科学版)*, 1999, 14(2): 175-179.
- [12] Jokinen E I, Vielma J, Aaltonen T M, et al. The effect of dietary phosphorus deficiency on the immune responses of European whitefish (*Coregonus lavaretus* L.) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2003, 15: 159-168.
- [13] Myrner K, R ed K H, Sevaldal S, et al. Changes in non-specific immune parameters in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., induced by *Aeromonas salmonicida* infection [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1993, 3: 253-265.
- [14] Ackerman P A, Iwana G K, Thornton J C. Physiological and immunological effects of adjuvanted *Aeromonas salmonicida* vaccines on juvenile rainbow trout [J]. *J Aquat Anim Health*, 2000, 12: 157-164.
- [15] Vivas J, Riano J, Carrascido B, et al. The avirulent and A mutant of *Aeromonas hydrophila* as a live attenuated vaccine against *A. salmonicida* infections in mirror trout (*Chorohadus nelsoni*) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2004, 16: 193-206.
- [16] Chen S-C, Yoshida T, Adams A, et al. Non-specific immune response of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, to extracellular products of *Mycobacterium* spp. and to various adjuvants [J]. *J Fish Dis*, 1998, 21: 39-46.
- [17] 高冬梅, 李 健, 王 群. 鳃弧菌灭活疫苗对牙鲆免疫效果的研究 [J]. *海洋水产研究*, 2004, 25(1): 34-40.
- [18] 吴志鹏, 王三英. 三联疫苗对大黄鱼常见细菌性疫病免疫保护的实验研究 [J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2004, 43(1): 115-118.
- [19] Zhou Yong-Cun, Huang Hai, Wang Jun, et al. Vaccination of the grouper, *Epinephelus aeneus*, against vibriosis using the ultrasonic technique [J]. *Aquaculture*, 2002, 203: 229-238.
- [20] Midtlyng P J, Reitan L J, Speilberg L. Experimental studies on the efficacy and side-effects of intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1996, 6: 335-350.
- [21] Arijo S, Rico R, Chabrillon M. Effectiveness of a divalent vaccine for sole, *Solea leugaleis* (Kaup), against *Vibrio harveyi* and *Photobacterium damela* subsp. *Piscicida* [J]. *J Fish Dis*, 2005, 28(1): 33-38.
- [22] Michel CB, Faivre B. Occurrence and significance of agglutinating antibodies in experimental furunculosis of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, Richardson [J]. *J Fish Dis*, 1982, 5: 429-432.
- [23] Fahey K J. Commercial perspectives on the development and application of veterinary vaccines [A]. *Vaccines in Agriculture* [C]. Melbourne: CSIRO Information Service (Kevin Jona), 1994: 5-11.
- [24] Amend D F, Johnson K A. Evidence for lack of antigenic competition among various combinations of *Vibrio anguillarum*, *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas salmonicida* and *Renibacterium salmoninarum* bacterins when administered to salmonid fishes [J]. *J Fish Dis*, 1984, 7: 293-299.

Immune efficacy of a bivalent vaccine for turbot against *Vibrio anguillarum* and *V. alginolyticus*

CAO Hong-mei^{1,2}, LI Jian², ZHAN Wen-bin¹

(1. Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy Fishery Science, Qingdao 266071, China)

Abstract: The most commonly encountered *Vibrio* species of pathogen in fish is *Vibrio anguillarum*, which is responsible for the majority of losses worldwide. *V. alginolyticus* also is common pathogen. The main objective of this work was to design a bivalent vaccine against these two bacteria and to study its effectiveness. The *V. anguillarum* vaccine, *V. alginolyticus* vaccine and a bivalent vaccine were prepared against these two pathogens from 0.3% formalin-killed cells without any adjuvant. The final concentrated bivalent vaccine that was produced using equal volumes of each monovalent vaccine were at 2×10^9 CFU/mL. Turbots (*Scophthalmus maximus*), body weight (31.2 ± 1.9) g, were divided into four groups, each with 30 or 60 individuals. The fish were immunized with the vaccines by single i. p. injection in a volume of 0.2 mL. Control group received 0.2 mL of PBS. The fish were starved for 2 days prior to vaccination. The efficacy of vaccines was evaluated by the measurement of alternative complement activity (ACH50), lysozyme activity, antibody titer and challenge of the two bacteria respectively. Plasma were collected per week from 15 turbot in each group and stored at -20°C . ACH50 and lysozyme activity were measured following Yano and Ellis. Antibody titer was determined by use of a microtitration agglutination test. At last the fish were challenged by i. p. injection of the bacterial suspension and monitored for 14 days. Mortalities were recorded daily. To evaluate the significance of the difference between vaccinated and unvaccinated turbot, statistical analysis was performed using SPSS software (11.0). The results indicated that the three vaccines enhanced the tested non-specific and specific immune functions. But the lysozyme activity and antibody titer of bivalent vaccine were lower than two monovalent vaccines in the last 2 - 3 weeks. ACH50 of bivalent vaccine became lower and lower from the beginning of experiment. In this work, the three immune parameters might be affected by two antigens administered contemporary. It might be the evidence of antigenic competition. The bivalent vaccine induced protection rates of 83.52% and 83.24% against *V. anguillarum* and *V. alginolyticus* respectively. The protection rates of *V. anguillarum* vaccine against *Vibrio anguillarum* and *V. alginolyticus* vaccine against *V. alginolyticus* were 80.37% and 74.89%. Immunological cross-reaction may be the possible mechanism between *V. anguillarum* and *V. alginolyticus*. In conclusion, this new bivalent vaccine is effective in protecting turbot against *V. anguillarum* and *V. alginolyticus*. It is possible to design a bivalent vaccine. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(3): 397 - 402]

Key words: *Scophthalmus maximus*; bivalent vaccine; *Vibrio anguillarum*; *Vibrio alginolyticus*

Corresponding author: LI Jian. E-mail: lijian@ysfri.ac.cn