

Perbandingan Filogenetik Protein Antigen-I yang Berpotensi sebagai Calon Diagnostik dan Vaksin terhadap Parasit *Cryptocaryon irritans* (Phylogenetic Comparison of I-Antigen Protein as Potential Candidate for Diagnostic and Vaccine for *Cryptocaryon irritans* Parasite)

YOGESWARAN LOKANATHAN*, ADURA MOHD-ADNAN & SHEILA NATHAN

ABSTRAK

Protein antigen-*i* parasit ikan *C. irritans* berpotensi tinggi digunakan sebagai calon dalam pembangunan vaksin komersial terhadap *C. irritans*. Walau bagaimanapun, kewujudan variasi pada antigen-*i* serotip *C. irritans* yang berbeza mempengaruhi tahap perlindungan yang bakal diberikan terhadap varians *C. irritans* yang berbeza apabila antigen-*i* digunakan sebagai vaksin. Kajian ini dijalankan untuk membandingkan jujukan pelbagai antigen-*i* pencilan *C. irritans* di Malaysia berbanding antigen-*i* pencilan *C. irritans* yang pernah dilaporkan. Perbandingan filogenetik dijalankan untuk meramalkan potensi protein tersebut dalam usaha membangunkan calon serodiagnostik dan pemvaksinan terhadap pencilan *C. irritans* yang berlainan. Penjajaran jujukan berbilang bagi jujukan asid amino antigen-*i* dilakukan dengan perisian CLUSTALX dan analisis filogenetik antigen-*i* dilakukan menggunakan kaedah parsimoni maksimum (MP) dan kaedah Bayes. Sembilan transkrip unik (TU) *C. irritans* yang mempunyai padanan signifikan dengan antigen-*i* di pangkalan data protein NCBI didapati mempunyai peratus kesamaan antara 41% hingga 71%. Kedua-dua pohon MP dan Bayesian yang dijana menunjukkan varians antigen-*i* *cn56* and *cn57* terkelompok bersama dalam satu kumpulan manakala varians antigen-*i* yang lain terbahagi kepada dua kumpulan berasingan dan pengkelompokan ini disokong oleh kehadiran asid amino yang terpuhara dalam kumpulan masing-masing. Kajian lanjutan boleh dilakukan untuk mengenal pasti varians antigen-*i* yang sesuai sebagai calon serodiagnosis dan juga dapat memberi perlindungan silang terhadap pelbagai pencilan *C. irritans* di serata dunia.

Kata kunci: Antigen-*i*; *Cryptocaryon irritans*; konformasi; perlindungan silang; serotip

ABSTRACT

The fish parasite *C. irritans* *i*-antigen protein has high potential to be developed as a commercial vaccine against *C. irritans*. However, variation within the *i*-antigens of different *C. irritans* serotypes affected the cross-protection provided towards different isolates of *C. irritans* when the *i*-antigen was evaluated as a candidate vaccine. This study was conducted to compare the sequences of various *C. irritans* *i*-antigens isolated in Malaysia with *i*-antigen sequences of previously reported *C. irritans* isolates. Phylogenetic comparison was performed to predict the protein's potential to be developed as a screening marker and vaccine candidate against various *C. irritans* isolates. Multiple sequence alignment of *i*-antigen amino acid sequences was undertaken using ClustalX and phylogenetic analysis of *i*-antigen was performed using the maximum parsimony (MP) and Bayesian methods. Nine *C. irritans* unique transcripts (UTs) had significant matches with *i*-antigen sequences in the NCBI protein database, with similarities ranging between 41 and 71%. Both MP and Bayesian trees generated showed that *i*-antigens *cn56* and *cn57* variants clustered together in one group while other *i*-antigen variants were divided over two different groups and the grouping was supported by the presence of conserved amino acids in their respective groups. Further research should identify variants of the *i*-antigen suitable for serodiagnostic candidates and provision of cross-protection against multiple strains of *C. irritans* globally.

Keywords: Conformation; cross protection; *Cryptocaryon irritans*; *i*-antigen; serotype

PENGENALAN

Penyakit bintik putih (*cryptocaryonosis*) yang disebabkan oleh *Cryptocaryon irritans* (Colorni & Burgess 1997; Dickerson & Dawe 1995) adalah penyakit parasit yang sering ditemui dalam industri marikultur dan membawa kerugian yang besar (Scholz 1999; Wright & Colorni 2002). Parasit ini menjangkiti semua jenis ikan kecuali elasmobranch dan simptom *cryptocaryonosis* yang utama adalah kewujudan nodul putih pada seluruh badan ikan

(Colorni & Burgess 1997). *C. irritans* adalah spesies tunggal dalam genus *Cryptocaryon*. Walaupun wujud perbezaan dalam ciri-ciri morfologi, ultrastruktur, perkembangan dan genetik pada pencilan dari lokasi yang berlainan, kesemua pencilan yang dikaji dianggap sebagai *C. irritans* kerana kepelbagaian yang dilaporkan tidak mengelompokkan pencilan-pencilan tersebut sebagai spesies yang berbeza (Colorni & Burgess 1997; Colorni & Diamant 1993; Diggles & Adlard 1997; Yambot et al. 2003).

C. irritans pada awalnya dianggap mempunyai hubungan rapat dengan parasit *Ichthyophthirius multifiliis*, iaitu penyebab penyakit bintik putih pada ikan air tawar. Walau bagaimanapun, kajian lanjut yang dilakukan selepas tahun 90-an berjaya menunjukkan bahawa parasit siliat tersebut mempunyai perbezaan ciri morfologi serta pertalian filogenetik yang jauh (Colorni & Diamant 1993; Diggles & Adlard 1995; Wright & Colorni 2002). Pelbagai faktor persekitaran seperti suhu dan saliniti serta spesies perumah mempengaruhi jangkitan dan perkembangan *C. irritans*. Perbezaan dalam parameter persekitaran *C. irritans* boleh membawa kepada perubahan pada peringkat genetik (Diggles & Adlard 1997; Sun et al. 2006; Yambot et al. 2003). Perbezaan genotip tersebut sejajar dengan perbezaan ekologi, biologi dan perkembangan strain yang berlainan (Diggles & Adlard 1997).

Salah satu protein *C. irritans* yang telah banyak dikaji adalah antigen aglutinasi/immobilisasi yang merupakan protein tambatan glikosilfosfatidilinositol (GPI). Antigen ini juga dikenali sebagai antigen imobilisasi (antigen-i) *C. irritans* (Hatanaka et al. 2008). Kehadiran antigen-i dikesan dalam siliat yang hidup bebas seperti *Tetrahymena thermophila* dan *Paramecium aurelia* (Hansma & Kung 1975) serta organisma siliat yang patogenik kepada ikan seperti *I. multifiliis* (Clark et al. 2001) dan *Philasterides dicentrarchi* (Iglesias et al. 2003). Kitar hidup *C. irritans* melibatkan beberapa peringkat berbeza iaitu trofon, tomon dan teron. Antigen-i ditemui hadir pada silia *C. irritans* pada peringkat kitar hidup trofon dan teron. Antibodi yang dihasilkan terhadap antigen ini didapati memberi perlindungan kepada perumah semasa jangkitan parasit tersebut serta menyebabkan aglutinasi dan immobilisasi silia parasit dalam asai aglutinasi (Bai et al. 2008; Hatanaka et al. 2007).

Kajian terdahulu membuktikan kewujudan variasi dalam antigen-i pada serotip *C. irritans* yang sama serta serotip yang berbeza (Hatanaka et al. 2008). Fenomena ini adalah selaras dengan antigen-i pada organisma siliat lain yang pernah dilaporkan (Bannon et al. 1986; Dickerson et al. 1993; Hansma & Kung 1975). Variasi antigen-i dalam siliat dikaitkan dengan kewujudan gen-gen berlainan dalam keluarga gen yang sama dan kewujudan gen yang spesifik-serotip (Clark et al. 1992; Dickerson et al. 1993; Smith et al. 1992). Dalam parasit siliat terutamanya *I. multifiliis*, antigen-i diramalkan terlibat dalam pengelakan sistem imun perumah. Antigen-i bertindak sebagai kemodulator untuk mengesan antibodi perumah terhadapnya dan memberi isyarat kepada parasit tersebut untuk melarikan diri daripada perumah tersebut tanpa menerusi peringkat perkembangan seterusnya (Clark & Dickerson 1997; Clark et al. 1996). Variasi protein antigen-i membantu parasit mengelak daripada dikesan oleh sistem imun perumah yang telah dijangkiti oleh parasit yang sama sebelum itu.

Antigen-i *C. irritans* berpotensi tinggi dibangunkan sebagai vaksin terhadap infeksi *C. irritans* kerana protein ini hadir pada peringkat teron dan trofon manakala antibodi terhadap antigen-i dapat mengaglutinasikan silium teron. Tambahan lagi, protein rekombinan antigen-i bersifat

imunogen dan melindungi ikan yang telah diimmunisasi daripada dijangkiti oleh *C. irritans* (Hatanaka et al. 2008; Josepriya et al. 2015, 2012). Salah satu masalah dengan penggunaan antigen-i sebagai vaksin atau penanda diagnostik adalah kewujudan variasi pada antigen-i serotip *C. irritans* yang berbeza. Ikan yang diimmunisasi dengan antigen-i satu serotip *C. irritans* tidak dapat mengesan antigen-i serotip *C. irritans* yang lain (Hatanaka et al. 2008; Misumi et al. 2011). Tambahan pula, ikan yang diimmunisasi dengan teron menunjukkan tahap perlindungan yang lebih tinggi berbanding ikan yang diimmunisasi dengan trofon atau tomon (Bai et al. 2008). Ini berkemungkinan disebabkan oleh ketiadaan varian antigen-i imunogen atau kehadiran kepekatan rendah varian antigen-i imunogen atau kewujudan varian antigen-i yang berbeza pada peringkat hidup yang berbeza.

Keupayaan untuk menyaring ikan menggunakan penanda molekul yang dapat mengesan penyakit *cryptocaryonosis* pada peringkat asimptomatik dan semasa muatan parasit masih rendah dapat membantu usaha menghalang perebakan parasit tersebut di sesuatu kawasan marikultur. Penanda molekul yang dikenal pasti boleh digunakan untuk menyaring stok ikan yang baru sebelum ianya dimasukkan ke dalam sangkar laut atau menentukan kemungkinan kehadiran parasit tersebut dalam sistem marikultur secara berkala. Kajian ini bertujuan untuk menganalisa pelbagai antigen-i yang pernah dilaporkan (Hatanaka et al. 2008, 2007; Josepriya et al. 2012) dari segi perbezaan filogenetik dan mencadangkan kesesuaian protein tersebut dalam usaha membangunkan kaedah penyaringan penciran *C. irritans* atau pembangunan calon vaksin terhadap *C. irritans*.

KAEDAH

PENGUMPULAN SAMPEL, PEMBINAAN PERPUSTAKAAN CDNA DAN PENJUJUKAN ANTIGEN-I

Kesemua langkah pemencilan, pengenalpastian secara pemerhatian morfologi, propagasi dan pengumpulan protozoa *C. irritans* dijalankan di Pusat Penyelidikan Kesihatan Ikan Kebangsaan, Institut Penyelidikan Perikanan, Pulau Pinang (Lokanathan et al. 2010). Pembinaan perpustakaan cDNA, penjujukan jujukan penanda terungkap (EST), analisis bioinformatik dan pengenalpastian transkrip unik (TU) yang mengkodkan protein antigen-i telah diterangkan dalam Lokanathan et al. (2010).

ANALISIS FILOGENETIK ANTIGEN-I

Analisis filogenetik protein antigen-i dilakukan untuk mengkaji pertalian antara pelbagai varians antigen-i yang dikenal pasti dalam *C. irritans*. Jujukan asid amino gen β -tubulin dan antigen-i *C. irritans* yang dikenal pasti dalam kajian ini diperolehi melalui analisis BLASTX dan translasi konseptual menggunakan aplikasi Virtual Ribosome (Wernersson 2006). Antigen-i daripada organisma lain

atau *C. irritans* pencilan lain dimuat turun daripada pangkalan data nukleotida dan protein NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Jadual 1). Penjajaran jujukan berbilang (*multiple sequence alignment*, MSA) bagi jujukan-jujukan asid amino tersebut dilakukan menggunakan perisian CLUSTALX (Thompson et al. 1997). Kaedah *maximum parsimony* (MP) dilakukan menggunakan perisian PHYLIP (Felsenstein 1989) melalui satu siri analisis yang berturutan menggunakan PROTPARS dan CONSENSE diikuti dengan penjanaan pohon-pohon MP menggunakan MEGA4 (Tamura et al. 2007). Seterusnya, nilai butstrap bagi 1000 replikasi diperoleh menggunakan SEQBOOT dan PROTPARS bagi menilai kebolehpercayaan dan keutuhan pertalian yang ditunjukkan dalam pohon filogenetik yang dijana (Felsenstein 1985). Hanya nilai butstrap melebihi 50% sahaja yang dicatatkan pada pohon filogenetik. Tambahan lagi, Pohon Bayesian juga dibina bagi data jujukan asid amino antigen-i menggunakan perisian MrBayes (Huelsenbeck & Ronquist 2001) dengan iterasi dua juta generasi bagi mendapatkan sisihan piawai <0.01.

HASIL

Sembilan TU daripada koleksi EST pencilan *C. irritans* tempatan (Lokanathan et al. 2010) yang mempunyai padanan dengan jujukan antigen-i *C. irritans* dalam pangkalan data protein NCBI, telah dikenal pasti. Sebanyak enam TU (cn39, cn40, cn41, cn42, cn57 dan cn101)

mempunyai padanan BLASTX terbaik dengan antigen-i isoform 1 manakala tiga TU (cn56, cn100 dan cn102) mempunyai padanan BLASTX terbaik dengan antigen-i isoform 4 pada pangkalan data protein NCBI. Ramalan tambatan GPI ke atas sembilan TU tersebut menunjukkan 6/9 TU (cn40, cn41, cn42, cn56, cn57 dan cn101) mengekodkan protein dengan tambatan GPI. Tiga TU (cn39, cn100 dan cn102) yang selebihnya tidak diramalkan sebagai protein bertambatan GPI kerana jujukan pada hujung 3'nya tidak lengkap atau isyarat peptida pada hujung 5'nya tidak diramalkan. Penjajaran jujukan berbilang bagi kesemua sembilan TU tersebut dan kesemua lapan jujukan antigen-i yang terdapat di pangkalan data protein NCBI menggunakan CLUSTALX menunjukkan sebanyak dua belas residu sistin dalam kesemua jujukan adalah terpulihara kecuali satu jujukan, iso5-G32 (Rajah 1). Asid amino sistin diketahui terlibat dalam pembentukan ikatan disulfida dan penting dalam pelipatan struktur protein. Oleh itu, kesemua TU tersebut dan antigen-i yang terdapat di pangkalan data awam berkemungkinan mempunyai konformasi dan fungsi yang sama.

Sebaliknya pula, analisis BLASTX menunjukkan lima (cn56, cn57, cn100, cn101 dan cn102) daripada sembilan TU tersebut mempunyai peratus persamaan yang agak rendah iaitu dalam lingkungan antara 41 dan 48% sahaja. Analisis filogenetik dilakukan untuk membandingkan kesemua homolog antigen-i yang dikenal pasti dalam kajian ini dengan antigen-i yang terdapat di pangkalan

JADUAL 1. Senarai jujukan yang digunakan dalam kajian ini

No.	Nama jujukan	No. Akses	Jenis jujukan
1.	cn39	GEEV01000039	
2.	cn40	GEEV01000040	
3.	cn41	GEEV01000041	
4.	cn42	GEEV01000042	
5.	cn56	GEEV01000056	
6.	cn57	GEEV01000057	
7.	cn100	GEEV01000100	
8.	cn101	GEEV01000101	
9.	cn102	GEEV01000102	
10.	G32-isoform1	AB262047	Jujukan nukleotida yang ditranslasikan kepada jujukan protein
11.	G32-isoform2	AB262048	
12.	G32-isoform3	AB262049	
13.	G32-isoform4	AB262050	
14.	G32-isoform5	AB262051	
15.	G37	AB381932	
16.	Taiwan1	FJ167511	
17.	Taiwan2	FJ167512	
18.	Im1	AAC36158	
19.	Pt2	CAI44460	Jujukan protein
20.	Tt2	XP_001012530	

```

          10          20          30          40          50          60
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
cn56      ----- IALLVSLTISTQAAF TAVTAMADWKG SFVVTKSTCNQYCGWKLGSQVDITEKST
cn57      ----F IALLVSLTISTQAAF AVVTS MADWKGTFVVTKSSCNQYCGWKVGTQVVITEKTA
cn40      ----LAILLIS SLAVFASANWVEKTAADWKGTFVVTSSSCLASC GWKIGTTVVIADKAS
cn39      ----LAILLIS SLAVI SSAAWAEKTAIADWKGTFVVTKSSCLATCGWKIGTTIVIAEKSG
cn42      ----LAILLIS SLAVI SSAAWAEKTAIADWKGTFVVTKSSCLATCGWKIGTTIVIAEKTG
Taiwan2   MQKILAILLIS SLAVI SSAAWAEKTAIADWKGTFVVTKSSCLATCGWKIGTTIVIAEKTG
iso1-G32  MQKII SILLIS SLAVMTSAAWAPKTAADWKGTFVVTKSSCLATCGWKIGTTIVIAADKTG
iso2-G32  ----- AAWAPKTAADWKGTFVVTKSSCLATCGWKIGTTIVIAADKTG
iso5-G32  ----- IS SLAVMTSAAWAPKTAADWKGTFVVTKSSCLATCGWKIGTTIVIAADKSG
iso3-G32  ----- IS SLAVMTSAAWAPKTAADWKGTFVVTKSSCLATCGWKIGTTIVIAADKSG
iso4-G32  ----- IS SLAVMTSAAWAPKTAADWKGTFVVTKSSCLATCGWKIGTTIVIAADKSG
Taiwan1   MQKILAILLIS SLAVI TSAAFVKKTAADWKGTFVVTKSSCLATCGWKIGTTIVIAADKTG
cn41      ----VAILLIS SFVAI SSAAWVAKTTAADWKGTFVVTSSSCLATCGWKIGTTVVIADKTG
cn100     ---GLIALFIASFALLNQC AFVEKTTVADWTGTFIVVKATCSASC SYKLGSEIKITATTG
cn101     ----- IALLIASFALLNQC AWFVEKTTVADWTGTFIVVKATCSASC SYKLGSEIKITATTA
G37      MSKFI IALLIASFALLNQC AWFVEKTAIADWTGTFIVVKATCSASC SYKLGSEIKITPTTG
cn102     ----- IASFALLNHCAFVEKTTVADWTGTFIVVKATCSASC SYKLGTEVKITETAG

          70          80          90          100         110         120
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
cn56      T---VATWTGT TFTSD TTNAEVTTAGA CQYAKEKGS--TAIAKVDILT KTDDCTISSGAC
cn57      T---VATWTGT TFTSD TTNAE I TAAGV CQYAKEKTA--AAIAKVDILS KTDDCTIATGAC
cn40      D-ATKVTWVGT AHTTD STNVD VASG-SCKYVS AVANAGTPGTAAEVLNNDDECAFASGVC
cn39      D-NTKATWVGS VHTTD ATNVD VASG-SCKYVS VVATAGTAGTAAEVLKNDDECFVGTGIC
cn42      D-NTKATWVGT VHTTD ATNVD VATG-SCKYVS VVAAAAGTPGTAAEVLKNDDECFVGTGMC
Taiwan2   D-NTKVTWVGT VHTTD ATNVD VASG-SCKYVS VVAAAAGTPGTAAEVLKNDDECFVATGMC
iso1-G32  D-SSKVTWVGT VHTTD STNVD VVSG-SCKYVS VVATAGTAGTPAEVLKNSDECAFATGTC
iso2-G32  D-SSKVTWVGT VHTTD STNVD VVRG-SCKYVS VVATAGTAGTPAEVLKNSDECAFATGTC
iso5-G32  D-NTKVTWVGT VHTTD STNVD VTSG-SCKYVS VVATAGTAGTPAEVLKNSDECAFATGTC
iso3-G32  D-NTKVTWVGT VHTTD STNVD VTSG-SCKYVS VVATAGTAGTPAEVLKNSDECAFATGTC
iso4-G32  D-NTKVTWVGT VHTTD STNVD VTSG-SCKYVS VVATAGTAGTPAEVLKNSDECAFATGTC
Taiwan1   V-NTKVTWVGT THTTD TTNVD VAAG-SCKYIS AVTTAGQAGTPAEVANNNDDECFASGTC
cn41      D-ATKVTWVGT VHTTD TTNVD VATG-SCKYVS IVATEGQVGTATEVLNNDDECFEFGNAC
cn100     ATTTKTTWAGT AVSTD TADVT VASG-ACQYVT SVAS-GAPTAADVVLKDADEC VVATGIC
cn101     TPTTKTTWAGT VISSD TDDVT VASG-VCSYVT SVAG-GTPAAAAEVLKDADEC TVATGIC
G37      ATTTKTTWAGT AHSTD STDVT VASG-TCKYVT SVAS-GTPAAAAEVLKDADEC VVATGIC
cn102     STSTKTTWAGT ASSTD STDVT VASG-KCSYVT SVTS-GTADAADVILNDADEC TVATGIC

          130         140         150         160         170         180
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
cn56      TVMGQKAVTAANTEFKRDKALATKPLQITYPQWQLVA-LSTTATTNAADIVAKCITEADM
cn57      TVMGQKAATTANTEFKRDTTVATKPLQITYPQWTLTP-LTTSTATAASDIAAKCITEADM
cn40      TVMGQKQKTPAKVTFKRDTTLDTKPFQILYKQLAMVPKAQTTVQAAA-DQAADCOTQASL
cn39      TIMGQKQKTPPKVTFNRDTALDTKPLQILYKQFEMVAKTSTAQKTSATDQAADCOTQASM
cn42      TIMGQKQKTPAKITFNRDTALDTKPLQVLYKQFEMVPKSSTQKATATDQAADCOTQASM
Taiwan2   TIMGQKQKTPAKITFNRDTTLDTKPLQVLYKQFEMVQKSSTQKAAATDQAADCOTQASM
iso1-G32  GIMGRKQSTPGTVTFNRDTTLDTKPLQILYKQFAMVQKTSTTQKATATDQAANCOTQASF
iso2-G32  GIMGRKQSTPGTVTFNRDTTLDTKPLQILYKQFAMVQKTSTTQKATATDQAANCOTQASF
iso5-G32  SIMGRKKATPGTVTFNRDMTLDTKPFQILYKQFEMVQKTSTTQKATATDQAADCOTQASF
iso3-G32  SIMGRKKATPGTVTFNRDMTLDTKPFQILYKQFEMVQKTSTTQKATATDQAADCOTQASF
iso4-G32  SIMGRKKATPGTVTFNRDMTLDTKPFQILYKQFEMVQKTSTTQKATATDQAADCOTQASF
Taiwan1   TVMGRKQKTPGTVTFNRDMDLDTKPLQILYKQFEMIAKSSTSVKAAA-DQGADCOTQASL
cn41      TVMGKKQKTPGVVAFKRDMDLDTKPFQILYKQVEMVKKSTTQKAAATDQANDCOTQASL
cn100     TVQGQKQTTAGKINFKRMDLATKPFQTTYKQWSVIKPKTSTTNTAVSDQGTDCVTEADM
cn101     TVQGQKQTSAGKINFKRMDLATKPFQTTYKQWVVIKPKTSTVNTAASDQGTDCVTEADM
G37      TTQGQKQTTAGKINFKRMDMATKPFQTTYKQLKVIKPKTSTTNAAADQTDACVTEADM
cn102     TNQGQKQTTGKINFKRMDLATKPFQTTYKQWKVIKPKTSTTAAAAADQTDACVTEADM

```

Sambungan RAJAH 1

	190	200	210	220	230	240
cn56	IDTTVDVKDL	AGTVTLTSAT	CGTCTWD	STKTLKITQ-	DSTKKYMKLEGLTK-ESTTGS
cn57	VDTTVDVKGLS	GTVTLTSAS	CGTCTWD	STKTLKITQ-	DSTKKYMKLEGLTK-ENPAGS
cn40	VDTTTDAKSI	VGTLKLSKAT	CDKCSWD	TTKDLKITQ-	DATKKYMTFLAGTIK-ETTS
cn39	VDTTTDAKAI	VGTLKLSKAA	CNKCSWD	TTKDLKITQ-	DATNKYMTFLAGTIK-ETAT
cn42	VDTTTDAKAI	VGTLKLSKAV	CNKCSWD	TTKDLKITQ-	DATNKYMTFLAGTIK-ETAT
Taiwan2	VDTTTDAKAI	VGTLKLSKAV	CNKCSWD	TTKDLKITQ-	DATNKYMTFLAGTIK-ETAT
iso1-G32	VDTTTDAKAI	VGSLKLSKAS	CDKCSWD	TTKDLKITQ-	DASKKYMTFLAGTIK-ETAT
iso2-G32	VDTTTDAKAI	VGSLKLSKAS	CDKCSWD	TTKDLKITQ-	DASKKYMTFLAGTIK-ETAT
iso5-G32	VDITTDAKAI	VGTLKLSKAS	CDKCSWD	TTKDLKITQ-	NASKKYMTFLAGTIK-ETAT
iso3-G32	VDITTDAKAI	VGTLKLSKAS	CDNCSWD	TTKDLKITQ-	NASKKYMTFLAGTIK-ETAT
iso4-G32	VDITTDAKAI	VGTLKLSKAS	CDNCSWD	TTKDLKITQ-	NASKKYMTFLAGTIK-ETAT
Taiwan1	VDITTDAKPI	VGTLKLSKAT	CDKCSWD	ITKDLKITQ-	DATNKYMTFLAGTIK-ETAT
cn41	VDTTTDAKAI	VGTLKLSKAT	CDKCSWD	TSKDLKITQ-	DATKKYMTFLAGTIK-ETTAG
cn100	VDTALDAKE	IVGTLKLSA	AGSCSWD	TSKELKISQHD	STKKYMTFLAGTIKGSAA
cn101	IDTALDAKD	IVGTLKLSA	AGSCSWD	ITKELKISQHD	SAKKYMTFLAGTIKGTGAS
G37	VDTALDAKD	IVGTLKLSA	AGSCSWD	TSKELKISQHD	SSKKYMTFLAGTIKGSVA
cn102	IDTTLDAKD	IVGTLKLSA	AGTCSWD	TSKELKISQD	STKKYMTFLAGTIKGSAA
	250	260	270	280	290	300
cn56	TGKLTTAEN	CHAIKIDST	ANKYYLYG	CTTLWPTGG	IPATLATASGKTTLTLEWSD
cn57	TGKLTNAEN	CHAIKIDST	AEKYYLYG	CTTLWPTGG	IPITLTASGKTTLSMSWSD
cn40	KNKLTASEA	CYVTKK-DD	KTFILVS	CTTLDTTNK	GIPAIITTVNSKTTLTLTWD
cn39	KDKLTASEK	CYVTKK-DD	KTYILVS	CTT-----	-----
cn42	KDKLTASEK	CYVTKK-DD	KTYILVS	CTTLDTTNS	GIPIVIAIVSSKTTLTMTWTD
Taiwan2	KDKLTASEK	CYVTKK-DD	KTYILVS	CTTLDTTNS	GIPIVIAIVSSKTTLTMTWTD
iso1-G32	NNKLTASEA	CYVTKK-DD	KTYVLVS	CATLDTT	SKGIPAIITANSKTTLTMTWTD
iso2-G32	NNKLTASEA	CYVTKK-DD	KTYVLVS	CATLDTT	SKGIPAIITANSKTTLTMTWTD
iso5-G32	NNKLTASEA	CYVTKK-DD	KTYVLVS	CATLDTT	SKGIPAIITANSKTTLTMTWTD
iso3-G32	NNKLTASEA	CYVTKK-DD	KTYVLVS	CATLDTT	SKGIPAIITANSKTTLTMTWTD
iso4-G32	NNKLTASEA	CYVTKK-DD	KTYVLVS	CATLDTT	SKGIPAIATANSKTTLTMTWTD
Taiwan1	KNKLTASET	CYVTKK-DD	KTFILVS	CTTLDTT	GSGIPIVISTVNSKTTLTLTWKDATAQA
cn41	ANKLTASET	CYVTKK-DD	KTYILVS	CTTLDTTNK	GIPAIITTVSSKTTLTLTWD
cn100	TNKL-----	-----	-----	-----	-----
cn101	TNKLDTTEK	CYAACK-D	ANNWAVFG	CTTLQSP	TGGGIPIVKATVSSKTTYTLTWT-SGSDN
G37	TNKLDTATEK	CYAACK-D	ANNWAVFG	CTTLQSP	VGGGIPIVKATASGKTTLTMAWQ-SGSDN
cn102	TNKLNTTEK	CYAACK-D	ANNWAVFG	CTTLQSP	PLGGGIPIVKATVSSKTTYTLAWT-SGSDN
	310	320	330			
cn56	CKVEGSFA	AGGTTNAL	KMISGLSM	LLLLALS	LLLLK
cn57	CKVEGSFA	AGGTTNAI	KIFSGLSM	LLLLALG	LLLFK
cn40	CNVVGEIT	STSGSNSL	KMFSGLS	AMIIIA	FALFK
cn39	-----	-----	-----	-----	-----
cn42	CNVVGEVT	SSSGSISL	KMFTGFS	AMLI	LAFALLFK
Taiwan2	CSVVGEVT	STSGSISL	KMFTGFS	AMLI	LAFALLFK
iso1-G32	CSVVGEVT	SSSN--SV	KLISGFS	AMLI	LSLALLFK
iso2-G32	CSVVGEVT	SSSN--SV	KLISGFS	AMLI	LSLALLFK
iso5-G32	CSVVGEV	SSSN--SV	KLISGFS	AMLI	LSFALLFK
iso3-G32	CSVVGEV	SSSN--SV	KLISGFS	AMLI	LSFALLFK
iso4-G32	CSVVGEV	SSSN--SV	KLISGFS	AMLI	LSFALLFK
Taiwan1	CNVVGEV	SSTSGANS	LKFTGL	SVMLI	LTFALLFK
cn41	CNVVGEVT	STSGSNSL	KILSGFS	AMLI	LAFALLYK
cn100	-----	-----	-----	-----	-----
cn101	CKVVGEFT	SGSGSNA	FKLFSGL	SMMLV	IALGLLFK
G37	CKVVGEVT	STSGSNAL	RYISN	ISMMLI	IALALLFK
cn102	CKVVGEFT	SGS-SSA	LKIFSGF	SMMLV	IALSILFR

RAJAH 1. Penjajaran jujukan berbilang antigen-i *C. irritans* penciran Malaysia dan juga varians pelbagai penciran *C. irritans* dari serata dunia. Kotak hitam menandakan kedudukan asid amino sistina (c) yang terpulihara merentasi varians antigen-i yang dikaji

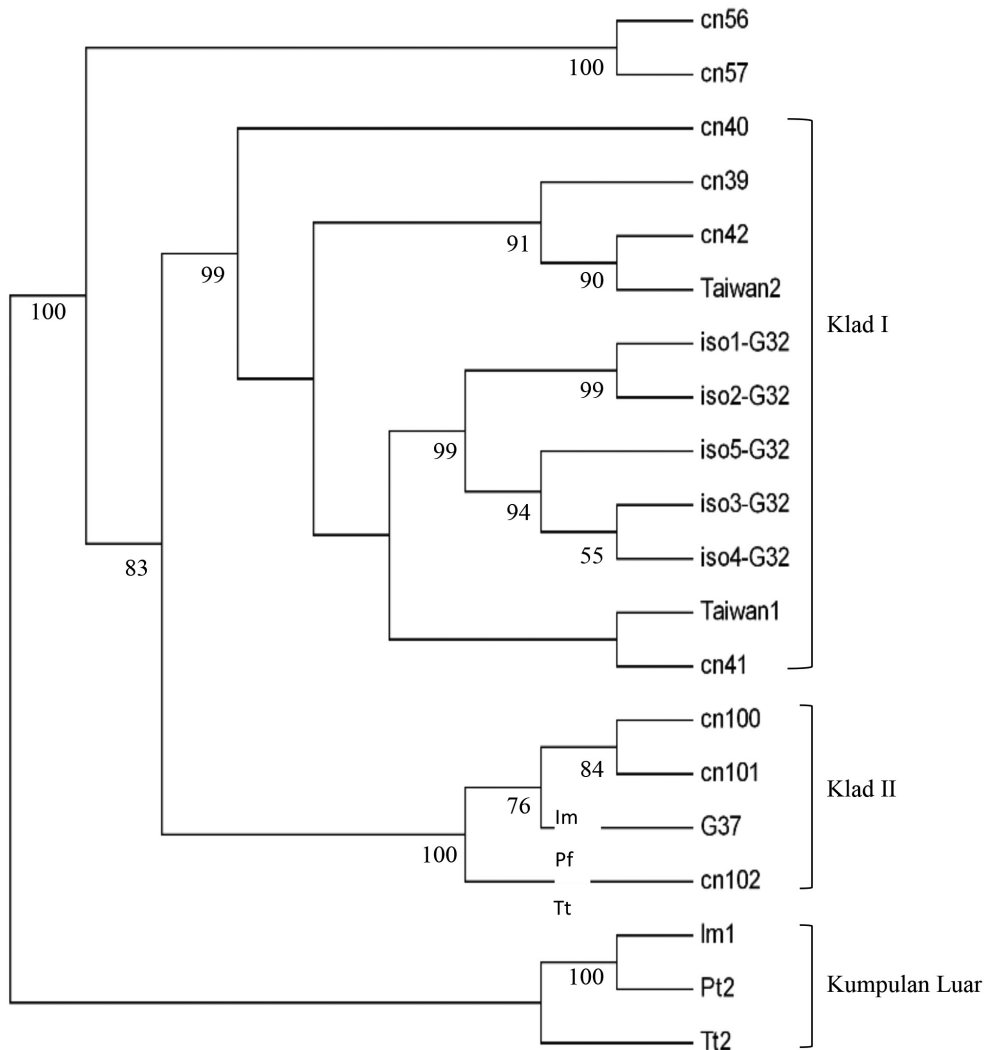
data protein NCBI. Hasil penjajaran jujukan berbilang ke atas 17 jujukan gen antigen-i *C. irritans* dan tiga antigen-i organisma siliat lain (*I. multifiliis*, *P. tetraurelia*, *T. thermophila*) yang digunakan sebagai kumpulan luar diperhatikan dan kawasan penjajaran yang tidak berkualiti di bahagian permulaan dan akhir jujukan-jujukan tersebut hasil jujukan yang tidak lengkap, disunting keluar terlebih dahulu. Pohon filogenetik yang dibina menggunakan kaedah MP dengan iterasi sebanyak 1000 kali dan juga pohon yang dibina dengan program MrBayes menunjukkan wujudnya perbezaan yang nyata antara pelbagai varians antigen-i yang dikaji (Rajah 2). Kesemua jujukan yang dikaji adalah monofiletik dan disokong dengan nilai butstrap 100% (Rajah 2(a) dan kebarangkalian posterior 100 (Rajah 2(b)).

Jujukan cn56 dan cn57 terkelompok bersama dan berbeza daripada varians antigen-i yang lain dengan nilai butstrap 100% dan kebarangkalian posterior 100 (Rajah 2). Tambahan lagi, matriks identiti jujukan yang dijana menggunakan perisian BioEdit (Jadual 2) menunjukkan

jujukan cn56 dan cn57 mempunyai persamaan jujukan asid amino sebanyak 80% manakala peratus persamaan kedua-dua jujukan tersebut dengan varians antigen-i *C. irritans* yang lain adalah <50%.

Sebanyak 15 jujukan gen antigen-i yang selebihnya terbahagi kepada 2 klad dan disokong dengan nilai butstrap 83% (Rajah 2(a)) dan kebarangkalian posterior 60 (Rajah 2(b)). Klad I terdiri daripada jujukan cn39, cn40, cn41, cn42, Taiwan1, Taiwan2 dan isoform1 hingga 5 serotip G32 dan disokong dengan nilai butstrap 99% (Rajah 2(a)) dan kebarangkalian posterior 79 (Rajah 2(b)). Persamaan jujukan asid amino varians antigen-i serotip G32 adalah dalam julat antara 92-100%. Klad II pula terdiri daripada jujukan cn100, cn101 dan cn102 yang terkelompok bersama dengan antigen-i *C. irritans* serotip G37 dengan nilai butstrap 100% dan kebarangkalian posterior 100. Pengkelompokan ini juga disokong oleh peratus persamaan jujukan antara jujukan dalam kumpulan tersebut. Jujukan-jujukan dalam klad I mempunyai peratus persamaan jujukan antara 76-100% manakala peratus persamaannya

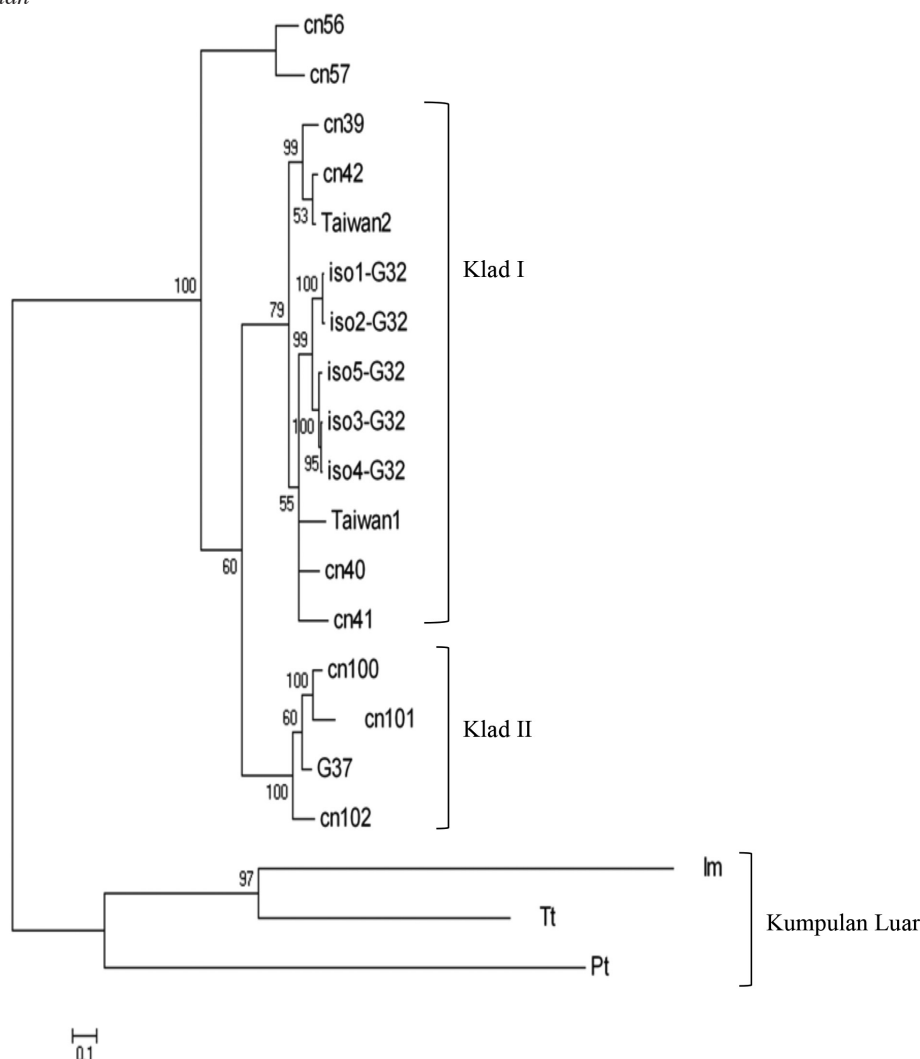
(a) Pohon Parsimoni Maksimum (MP)



bersambung

Sambungan RAJAH 2

(b) Pohon Bayesian



RAJAH 2. Analisis filogenetik jujukan peptida antigen-*i* *C. irritans* dengan jujukan antigen-*i* *I. multifiliis* (Im), *P. tetraurelia* (Pt) dan *T. thermophila* (Tt) sebagai kumpulan luar. Jujukan cn# adalah jujukan antigen-*i* *C. irritans* yang EST yang dilaporkan dalam Lokanathan et al. (2010) manakala semua jujukan yang lain diperolehi daripada pangkalan data NCBI. Jujukan G37 dan iso#-G32 adalah jujukan antigen-*i* *C. irritans* pencilan Jepun manakala jujukan Taiwan# adalah jujukan antigen-*i* *C. irritans* pencilan Taiwan (a) Pohon MP. Nombor di setiap titik percabangan menunjukkan nilai *bootstrap* untuk 1000 iterasi fail data dan (b) Pohon Bayesian yang dibina dengan program MrBayes. Nombor di setiap titik percabangan menunjukkan kebarangkalian posterior selepas 2×10^6 generasi

dengan jujukan dalam kladi II adalah antara 46-60% sahaja (Jadual 2). Hasil penjajaran jujukan berbilang (Rajah 1) juga menunjukkan beberapa perbezaan nyata antara jujukan asid amino antigen-*i* kedua-dua kumpulan tersebut. Antaranya ialah kawasan asid amino pada kedudukan 262 hingga 272 dengan kesemua varians antigen-*i* dalam kladi I mempunyai jujukan asid amino (I/V)LVSC(T/A)TLDDT manakala varians antigen-*i* dalam kladi II mempunyai jujukan AVFGCTTLQSP. Tambahan lagi, asid amino pada kedudukan 31, 35-37, 109, 130, 142, 157, 198, 217, 219, 233-234, 274, 280, 290, 300, 324 dan 328 berbeza antara jujukan antigen-*i* kladi I dan kladi II.

Kajian terdahulu ke atas rDNA *C. irritans* serotip G37 menunjukkan jujukan ini mempunyai peratus persamaan

yang paling tinggi (93%) dengan pencilan *C. irritans* dari Israel dan Malaysia manakala rDNA *C. irritans* serotip G32 adalah seiras dengan rDNA *C. irritans* pencilan Ping Tung, Taiwan dan pencilan USA (Hatanaka et al. 2008). Pengkelompokan antigen-*i* isoform 1 hingga 5 *C. irritans* serotip G32 (Hatanaka et al. 2007) dalam satu kumpulan yang berbeza daripada jujukan antigen-*i* G37 (CISA-37) *C. irritans* serotip G37 menyokong penemuan Hatanaka et al. (2008) bahawa kedua-dua serotip *C. irritans* tersebut mengekspreskan antigen-*i* yang berlainan dan antibodi daripada ikan yang diimmunisasi dengan antigen-*i* serotip *C. irritans* tertentu tidak memberi perlindungan saling terhadap antigen-*i* daripada serotip lain. Pengkelompokan kesemua antigen-*i* serotip G32 ke dalam kelompok yang

JADUAL 2. Matriks identiti jujukan antigen-i menunjukkan jujukan cn56 dan cn57 mempunyai persamaan jujukan asid amino yang tertinggi manakala peratus persamaan kedua-dua jujukan tersebut dengan varians antigen-i *C. irritans* yang lain adalah <50%

Jujukan	cn56	cn57	iso1-G32	iso2-G32	iso5-G32	iso3-G32	iso4-G32	cn40	cn41	Taiwan1	cn39	Taiwan2	cn42	cn102	G37	cn101	cn100
cn56	1	0.799	0.456	0.456	0.452	0.456	0.456	0.484	0.474	0.484	0.497	0.479	0.488	0.488	0.461	0.461	0.461
cn57	0.799	1	0.479	0.479	0.465	0.47	0.47	0.488	0.47	0.479	0.479	0.484	0.479	0.484	0.457	0.466	0.461
iso1-G32	0.456	0.479	1	0.995	0.926	0.931	0.931	0.798	0.784	0.788	0.825	0.834	0.807	0.524	0.552	0.52	0.506
iso2-G32	0.456	0.479	0.995	1	0.922	0.926	0.926	0.793	0.784	0.788	0.821	0.83	0.807	0.52	0.547	0.515	0.502
iso5-G32	0.452	0.465	0.926	0.922	1	0.986	0.986	0.793	0.788	0.802	0.83	0.83	0.802	0.524	0.552	0.515	0.506
iso3-G32	0.456	0.47	0.931	0.926	0.986	1	1	0.788	0.788	0.798	0.825	0.825	0.798	0.529	0.556	0.52	0.511
iso4-G32	0.456	0.47	0.931	0.926	0.986	1	1	0.788	0.788	0.798	0.825	0.825	0.798	0.529	0.556	0.52	0.511
cn40	0.484	0.488	0.798	0.793	0.793	0.788	0.788	1	0.816	0.792	0.779	0.807	0.779	0.579	0.583	0.556	0.547
cn41	0.474	0.47	0.784	0.784	0.788	0.788	0.788	0.816	1	0.788	0.77	0.77	0.761	0.556	0.547	0.542	0.552
Taiwan1	0.484	0.479	0.788	0.788	0.802	0.798	0.798	0.792	0.788	1	0.775	0.788	0.77	0.538	0.542	0.538	0.529
cn39	0.497	0.479	0.825	0.821	0.83	0.825	0.825	0.779	0.77	0.775	1	0.899	0.912	0.547	0.565	0.547	0.542
Taiwan2	0.479	0.484	0.834	0.83	0.83	0.825	0.825	0.807	0.77	0.788	0.899	1	0.963	0.556	0.597	0.57	0.565
cn42	0.488	0.479	0.807	0.807	0.802	0.798	0.798	0.779	0.761	0.77	0.912	0.963	1	0.542	0.583	0.556	0.552
cn102	0.488	0.484	0.524	0.52	0.524	0.529	0.529	0.579	0.556	0.538	0.547	0.556	0.542	1	0.85	0.8	0.831
G37	0.461	0.457	0.552	0.547	0.552	0.556	0.556	0.583	0.547	0.542	0.565	0.597	0.583	0.85	1	0.84	0.881
cn101	0.461	0.466	0.52	0.515	0.515	0.52	0.52	0.556	0.542	0.538	0.547	0.57	0.556	0.8	0.84	1	0.872
cn100	0.461	0.461	0.506	0.502	0.506	0.511	0.511	0.547	0.552	0.529	0.542	0.565	0.552	0.831	0.881	0.872	1

sama tetapi berbeza daripada jujukan antigen-i yang lain dalam klad I disokong dengan nilai butstrap 99% dan kebarangkalian posterior 99. Gen antigen-i Taiwan2 (Nombor panggilan GenBank: ACN89783) didapati lebih rapat dengan cn39 dan cn42 berbanding varians antigen-i yang lain. Ini disokong oleh nilai butstrap 99% dan kebarangkalian posterior 79. Persamaan antara jujukan asid amino antigen-i subkumpulan tersebut adalah dalam julat antara 90-96% manakala peratus persamaan antara jujukan asid amino subkumpulan tersebut dengan antigen-i lain adalah kurang daripada 83%.

PERBINCANGAN

Antigen-i, yang merupakan suatu protein tambatan GPI, diekspreskan pada aras yang tinggi pada peringkat tomon *C. irritans* (Lokanathan et al. 2010). Sembilan TU *C. irritans* yang mempunyai padanan signifikan dengan antigen-i di pangkalan data protein NCBI didapati mempunyai peratus kesamaan antara 41 dan 71%. Analisis filogenetik juga menunjukkan varians antigen-i yang dikenal pasti dalam kajian ini mempunyai pertalian dengan varians antigen-i yang terdapat di pangkalan data protein NCBI (Rajah 2). Kedua-dua pohon MP dan Bayesian yang dijana menunjukkan varians antigen-i cn56 and cn57 terkelompok bersama dalam satu kumpulan manakala varians antigen-i yang lain terbahagi kepada dua kumpulan yang lain dan pengkelompokan ini disokong oleh kehadiran asid amino yang terpulihara dalam kumpulan masing-masing. Walau bagaimanapun, implikasi perbezaan asid amino tersebut pada varians antigen-i tidak diketahui kerana tiada domain yang ditemui pada jujukan asid amino antigen-i yang dikaji melalui pencarian InterProScan (Mulder & Apweiler 2007). Variasi antigen-i pencilan *C. irritans* tempatan mungkin disebabkan oleh dua fenomena. Pertamanya, kehadiran serotip-serotip *C. irritans* yang pelbagai (populasi heterologus) pada kawasan persampelan telah menyumbang kepada variasi antigen-i dalam kajian ini (Misumi et al. 2011). Keduanya, pengekspresan antigen-i yang berlainan oleh serotip *C. irritans* yang sama berlaku melalui variasi antigenik. Variasi antigenik adalah mekanisme genetik yang sering diperhatikan dalam organisma protozoa di mana berlakunya penukaran ahli gen yang diaktifkan daripada famili multigen untuk mengekspres antigen permukaan yang berlainan (Steverding 2007). Oleh yang demikian, variasi pada jujukan asid amino antigen-i yang ditemui dalam kajian ini dijangka menyumbang kepada pembentukan tapak antigenik yang berlainan pada varians antigen-i yang pelbagai. Siliat berkemungkinan telah mengembangkan ahli keluarga gen antigen-i sebagai gerak balas kepada perubahan persekitaran (Kusch & Schmidt 2001) ataupun sebagai strategi hidup untuk menceroboh sistem keimunan perumah dengan menghalang pengecaman oleh perumah melalui tapak antigen-i yang berbeza (Clark et al. 1996; Steverding 2007). Kajian ke atas *I. multifiliis* menunjukkan pengekspresan antigen-i dikawalatur mengikut peringkat kitar hidupnya dan transkrip-transkrip antigen-i yang

berlainan diekspreskan pada kadar yang berbeza pada peringkat kitar hidup yang berlainan (Clark et al. 1992). Walau bagaimanapun mekanisme yang menyebabkan kewujudan dan pengawalaturan pengekspresan pelbagai varians antigen-i pada siliat parasit obligat masih belum dapat dipastikan (Xu et al. 2009).

Varians antigen-i yang ditemui dalam kajian ini diramalkan mempunyai konformasi dan fungsi yang sama dengan antigen-i yang pernah dilaporkan sebelum ini. Kajian ini dan kajian Hatanaka et al. (2007) telah menunjukkan bahawa antigen-i hadir pada semua peringkat *C. irritans*. Oleh itu, dicadangkan antigen-i sesuai dikaji selanjutnya sebagai sasaran diagnostik dan calon vaksin bagi pengesanan dan kawalan jangkitan *C. irritans*. Walau bagaimanapun, perbezaan dalam jujukan asid amino antigen-i berkemungkinan besar menyebabkan jujukan yang mengkodkan kawasan antigenik pada setiap antigen tersebut, berbeza. Kajian terdahulu juga menunjukkan keimunan yang diperoleh melalui imunisasi dengan antigen-i adalah spesifik-serotip (Hatanaka et al. 2008; Misumi et al. 2011). Oleh itu, gerak balas keimunan yang diaruhkan oleh setiap antigen-i perlu dikaji untuk membangunkan vaksin yang sesuai yang dapat memberi perlindungan silang. Maklumat tersebut juga akan membantu dalam pembangunan kaedah diagnostik yang boleh mengesan pelbagai serotip *C. irritans*.

Kajian kami juga mendapati kedua-dua antigen-i CN56 dan CN57 yang diekspres sebagai protein rekombinan dalam *E. coli* adalah bersifat antigenik dan dapat menyaring ikan terjangkit yang diperoleh daripada sangkar laut di Bukit Tambun Pulau Pinang dan dari pusat penternakan ikan di Tg. Demong, Terengganu (Lokanathan et al. 2016). Namun demikian, masalah penghasilan antibodi terhadap antigen-i yang spesifik serotip dengan tindakan yang lemah terhadap antigen-i serotip berlainan perlu dicari penyelesaian (Hatanaka et al. 2008; Misumi et al. 2011). Oleh itu, kajian lanjutan perlu dilakukan untuk memastikan antigen ini dapat menyaring koleksi ikan marikultur yang terjangkit dengan pelbagai serotip kerana perbezaan serotip dan ciri-ciri morfologi wujud antara *C. irritans* yang diperoleh dari lokasi yang berlainan (Diggles & Adlard 1997; Sun et al. 2006; Yambot et al. 2003).

KESIMPULAN

Kajian ini mendapati cn56 dan cn57 strain tempatan *C. irritans* terkelompok bersama dalam satu kumpulan manakala varians-variens antigen-i yang lain, termasuk antigen-i yang telah dipencilkan sebelum ini dari lokasi berlainan di serata dunia, terbahagi kepada dua kumpulan berasingan. Pengkelompokan ini disokong oleh kehadiran asid amino yang terpulihara dalam kumpulan masing-masing. Kajian seterusnya perlu memastikan sejauh mana kawasan antigenik (epitop) varians-variens ini adalah homologos sebelum dibangunkan protein ini sebagai calon protein untuk penyaringan pencilan *C. irritans* atau sebagai calon vaksin multivalen.

PENGHARGAAN

Projek ini telah dibiayai oleh Kementerian Sains, Teknologi dan Inovasi Malaysia di bawah Geran Program Inisiatif R & D (UKM-MGI-NBD006-2007).

RUJUKAN

- Bai, J.S., Xie, M.Q., Zhu, X.Q., Dan, X.M. & Li, A.X. 2008. Comparative studies on the immunogenicity of theronts, tomons and trophonts of *Cryptocaryon irritans* in grouper. *Parasitology Research* 102(2): 307-313.
- Bannon, G.A., Perkins-Dameron, R. & Allen-Nash, A. 1986. Structure and expression of two temperature-specific surface proteins in the ciliated protozoan *Tetrahymena thermophila*. *Molecular and Cellular Biology* 6(9): 3240-3245.
- Clark, T.G., Gao, Y.A.N., Gaertig, J., Wang, X. & Cheng, G. 2001. The I-antigens of *Ichthyophthirius multifiliis* are GPI-anchored proteins. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 48(3): 332-337.
- Clark, T.G. & Dickerson, H.W. 1997. Antibody-mediated effects on parasite behavior: Evidence of a novel mechanism of immunity against a parasitic protist. *Parasitology Today* 13(12): 477-480.
- Clark, T.G., Lin, T.L. & Dickerson, H.W. 1996. Surface antigen cross-linking triggers forced exit of a protozoan parasite from its host. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93(13): 6825.
- Clark, T.G., McGraw, R.A. & Dickerson, H.W. 1992. Developmental expression of surface antigen genes in the parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 89(14): 6363-6367.
- Colorni, A. & Burgess, P. 1997. *Cryptocaryon irritans* Brown 1951, the cause of 'white spot disease' in marine fish: An update. *Aquarium Sciences and Conservation* 1(4): 217-238.
- Colorni, A. & Diamant, A. 1993. Ultrastructural features of *Cryptocaryon irritans*, a ciliate parasite of marine fish. *European Journal of Protistology* 29(4): 425-434.
- Dickerson, H.W. & Dawe, D.L. 1995. *Ichthyophthirius multifiliis* and *Cryptocaryon irritans* (phylum Ciliophora). In Woo, P.T.K. (pnyt). *Fish Diseases and Disorders. Volume 1: Protozoan and Metazoan Infections*. Wallingford: CAB International. hlm. 181-227.
- Dickerson, H.W., Clark, T.G. & Leff, A.A. 1993. Serotypic variation among isolates of *Ichthyophthirius multifiliis* based on immobilization. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 40(6): 816-820.
- Diggles, B.K. & Adlard, R.D. 1997. Intraspecific variation in *Cryptocaryon irritans*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 44(1): 25-32.
- Diggles, B.K. & Adlard, R.D. 1995. Taxonomic affinities of *Cryptocaryon irritans* and *Ichthyophthirius multifiliis* inferred from ribosomal RNA sequence data. *Diseases of Aquatic Organisms* 22(1): 39-43.
- Felsenstein, J. 1989. PHYLIP-phylogeny inference package (version 3.2). *Cladistics* 5(1): 164-166.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39(4): 783-791.
- Hansma, H.G. & Kung, C. 1975. Studies of the cell surface of *Paramecium*. Ciliary membrane proteins and immobilization antigens. *Biochemical Journal* 152(3): 523-528.
- Hatanaka, A., Umeda, N. & Hirazawa, N. 2008. Molecular cloning of a putative agglutination/immobilization antigen located on the surface of a novel agglutination/immobilization serotype of *Cryptocaryon irritans*. *Parasitology* 135(9): 1043-1052.
- Hatanaka, A., Umeda, N., Yamashita, S. & Hirazawa, N. 2007. Identification and characterization of a putative agglutination/immobilization antigen on the surface of *Cryptocaryon irritans*. *Parasitology* 134(9): 1163-1174.
- Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17(8): 754-755.
- Iglesias, R., Paramá, A., Álvarez, M.F., Leiro, J., Ubeira, F.M. & Sanmartín, M.L. 2003. *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora: Scuticociliatida) expresses surface immobilization antigens that probably induce protective immune responses in turbot. *Parasitology* 126(2): 125-134.
- Josepriya, T., Chien, K.H., Lin, H.Y., Huang, H.N., Wu, C.J. & Song, Y.L. 2015. Immobilization antigen vaccine adjuvanted by parasitic heat shock protein 70C confers high protection in fish against cryptocaryonosis. *Fish & Shellfish Immunology* 45(2): 517-527.
- Josepriya, T., Lin, Y.H., Wang, Y.C., Yang, C.S., Chang, P.S. & Song, Y.L. 2012. Codon changed immobilization antigen (iAg), a potent DNA vaccine in fish against *Cryptocaryon irritans* infection. *Vaccine* 30(5): 893-903.
- Kusch, J. & Schmidt, H.J. 2001. Genetically controlled expression of surface variant antigens in free-living protozoa. *Journal of Membrane Biology* 180(2): 101-109.
- Lokanathan, Y., Mohd-Adnan, A., Kua, B.C. & Nathan, S. 2016. *Cryptocaryon irritans* recombinant proteins as potential antigens for sero-surveillance of cryptocaryonosis. *Journal of Fish Diseases*. In Press. doi: 10.1111/jfd.12474.
- Lokanathan, Y., Mohd-Adnan, A., Wan, K.L. & Nathan, S. 2010. Transcriptome analysis of the *Cryptocaryon irritans* tomont stage identifies potential genes for the detection and control of cryptocaryonosis. *BMC Genomics* 11(1): 1.
- Misumi, I., Lewis, T.D., Takemura, A. & Leong, J.A.C. 2011. Elicited cross-protection and specific antibodies in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) against two different immobilization serotypes of *Cryptocaryon irritans* isolated in Hawaii. *Fish & Shellfish Immunology* 30: 1152-1158.
- Mulder, N. & Apweiler, R. 2007. InterPro and InterProScan: Tools for protein sequence classification and comparison. *Methods Mol. Biol.* 396: 59-70.
- Scholz, T. 1999. Parasites in cultured and feral fish. *Veterinary Parasitology* 84(3-4): 317-335.
- Smith, D.L., Berkowitz, M.S., Potoczak, D., Krause, M., Raab, C., Quinn, F. & Doerder, F.P. 1992. Characterization of the T, L, I, S, M and P cell surface (immobilization) antigens of *Tetrahymena thermophila*: Molecular weights, isoforms, and cross-reactivity of antisera. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 39(3): 420-428.
- Steverding, D. 2007. Antigenic variation in pathogenic microorganisms: Similarities and differences. *African Journal of Microbiology Research* 1(7): 104-112.
- Sun, H.Y., Zhu, X.Q., Xie, M.Q., Wu, X.Y., Li, A.X., Lin, R.Q. & Song, H.Q. 2006. Characterization of *Cryptocaryon irritans* isolates from marine fishes in Mainland China by ITS ribosomal DNA sequences. *Parasitology Research* 99(2): 160-166.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24(8): 1596-1599.

- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25(24): 4876-4882.
- Wernersson, R. 2006. Virtual Ribosome-a comprehensive DNA translation tool with support for integration of sequence feature annotation. *Nucleic Acids Research* 34(suppl 2): W385-W388.
- Wright, A.D.G. & Colomi, A. 2002. Taxonomic re-assignment of *Cryptocaryon irritans*, a marine fish parasite. *European Journal of Protistology* 37(4): 375-378.
- Xu, D.H., Panangala, V.S., van Santen, V.L., Dybvig, K., Abernathy, J.W., Klesius, P.H., Liu, Z. & Russo, R. 2009. Molecular characteristics of an immobilization antigen gene of the fish parasitic protozoan *Ichthyophthirius multifiliis* strain ARS 6. *Aquaculture Research* 40(16): 1884-1892.
- Yambot, A.V., Song, Y.L. & Sung, H.H. 2003. Characterization of *Cryptocaryon irritans*, a parasite isolated from marine fishes in Taiwan. *Diseases of Aquatic Organisms* 54(2): 147-156.
- Yogeswaran Lokanathan*
Pusat Kejuruteraan Tisu, Fakulti Perubatan
Universiti Kebangsaan Malaysia, Jalan Yaacob Latiff
56000 Kuala Lumpur, Wilayah Persekutuan
Malaysia
- Adura Mohd-Adnan
Fakulti Sains, Teknologi, Kejuruteraan dan Matematik
INTI International University
71800 Bandar Baru Nilai, Negeri Sembilan
Malaysia
- *Pengarang untuk surat-menyurat; email: lyoges@ppukm.ukm.edu.my
- Diserahkan: 14 Jun 2016
Diterima: 26 Oktober 2016

Yogeswaran Lokanathan*, Adura Mohd-Adnan & Sheila Nathan
Pusat Pengajian Biosains dan Bioteknologi
Fakulti Sains dan Teknologi
Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 Bangi, Selangor Darul Ehsan
Malaysia