TITLE:

TickPath Layerplex: adaptation of a real-time PCR methodology for the simultaneous detection and molecular surveillance of tickborne pathogens

AUTHORS:

Joseph J. Modarelli¹, Pamela J. Ferro², Alberto A. Perez De Leon³, Maria D. Esteve-Gasent¹*

AFFILIATION:

- ¹ Department of Veterinary Pathobiology, College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, Texas A&M University, College Station, TX, 77843.
- ² Texas A&M Veterinary Medical Diagnostic Laboratory, Texas A&M University, College Station, TX, 77843
- ³USDA-ARS Knipling-Bushland U.S. Livestock Insects Research Laboratory and Veterinary Pest Genomics Center, Kerrville, TX, 78028.

^{*}Correspondence and requests for materials should be addressed to M.E.G. (email: MEsteve-Gassent@cvm.tamu.edu)

Supplementary Figure S1. Singleplex *in silico* specificity analysis depicted by oligonucleotide alignments for the forward primer, reverse primer, and probe sequences of (A) *B. burgdorferi*, (B) *B. hermsii*, (C) *B. parkeri*, (D) *B. turicatae*, (E) *E. ewingii*, (F) *E. chaffeensis*, (G) *E. canis*, (H) *A. phagocytophilum*, (I) *R. rickettsii*, and (J) pan-*Babesia* assays in 5' to 3' orientation. Assays were evaluated for analytical specificity against representative closely related species as indicated in Supplementary Tables S5-S10. Respective primers and probes used for analysis are highlighted in grey. The sequences for other species are only shown when they differ from respective species sequences. A dot indicates identity with the respective species sequence. Dashes in (A)-(C), (E)-(G) and (J) refer to an in/del, dashes in (D), (H) and (I) refer to absence of gene sequences. The second column indicates specificity in qualitative results (positive or negative). An asterisk represents hypothetical analysis based on NCBI BLAST analysis due to lack of available reference strains.

(A)	Organism	qPCl	R Bb.flaB.161F (5' → 3')	Bb.flaB.186P (5' → 3')	Bb.flaB.213R (5' → 3')
	B. burgdorferi	+	AAGAGGGTGTTCAACAGGA	A G G T C A A C A G C C A G C A C C T G C T A C A G C A	G A G A A T T A A C T C C G C C T T G A G A A
	B. garinii	-	A C A	A	A
	B. afzelii	-	C G . A	G A A	A
	B. anserina		A . C A A		
	B. miyamotoi	-	A . C A	G G C A G C T T A A G . C T	
	B. recurrentis	-	C A G A	A G C A G C T T A A G T	G A
	B. crocidurae	-	C A G A	A G C A G C T A A G T	G A
	B. turicatae	-	. G A C A G A	G G C T G C T A A G T	
	B. parkeri	-	. G A C A A	G G C T G C T A A G T	. T A
	B. hermsii GGI	-	A T A . G A G A	G . A G C A G C T T A A G T	. G A
	B. hermsii GGII	-	A T A . G A G A		
	B. coriaceae	-	СТ А СА		A
(B)	Organism q	_l PCR	Bh-1.flaB.531F / Bh-1.flaB.529F (5' → 3')	Bh.flaB.615P (5' → 3')	Bh-1.flaB.647R (5' → 3')
	B. hermsii GGI	+	G G G C G C A A A T C A G G A T G A G	A G C C T G A G C G C C T T C A C C T G C A A A A A G A	TCCTCTTGCTGTCCTATCTCTTGC
	B. hermsii GGII	+	G T G G G A G C A A A T C A G G A T G A G		
	B. turicatae	-	T	. A	C T G . A C C T C . G A
	B. parkeri	-	T A	. A	C T G . A C C T C . G A
	B. miyamotoi	-	A T	T T A	C C T G C C G A
	B. coriaceae B. anserina	-		G	C . T C T G . A C C T A
	B. crocidurae	-	T T	T A . T T G	C . T G . A C C A
	B. recurrentis	-	T T	T A . T T G T A C A	C . T G . A C C A
	B. burgdorferi		T C A A	C T G A G C A G T T T C A . A G	C . T C T A A . A C C A
	B. afzelii	-	A A	C T G A G C A G C T T C A	C . T C T A G . A C C A
	B. garinii	-	A A	$. \ \ . \ \ T \ \ C \ T \ \ G \ \ A \ \ G \ \ C \ \ A \ \ . \$	$C \ . \ T \ . \ . \ . \ . \ T \ . \ . \ A \ G \ . \ A \ C \ C \ T \ . \ . \ . \ . \ A$

(C) Organism	qPCF	Bp.flaB.406F (5' → 3')	Bp.flaB.443P (5' → 3')	Bp.flaB.522R (5' → 3')
B. parkeri	+	TTGTCCAATAAGTCAGCTGCTCAG	C T G A A G A G C T T G G A A T G C A A C C T G C A	T C T T A A T G T C C A T G A A G C T T G T G C
B. turicatae	-	C		
B. hermsii GG	I -	C A		C
B. hermsii GG	II -	C		C
B. anserina	-	T C	G	
B. coriaceae	-	T A G		C
B. miyamotoi	-	A T		C
B. recurrentis	-	A T G A T G		
B. crocidurae	-	A T G A T G . A		
B. burgdorferi	-	A A C A T T A	G	A A C A . A
B. afzelii	-	A C A T T . C A	G	A A
B. garinii	-	A C A T T . C A	A	G A
(D) Organsim	qPCR	Bt.bipA.728F / Bt.bipA.731F (5' → 3')	Bt.bipA.817P (5' \rightarrow 3')	Bt.bipA.869R (5' → 3')
B. turicatae 1		A G A C C G G T A C A C A G G A T T C T A A A G C	A G T T T T G G G A A G T G T T G T T G G T G G C G T	G T T C C T G C T C C C T G A A T A A C A T T A T C
B. turicatae 2		C C G G C A C A C A G G A T T C T A A A A C		
B. parkeri		. T T A A A	. A A	
B. hermsii GGI	_	T T C . C . G T C . T G . A . A G T A	. A G A . T A T G . A C A G A A G A .	C T T G C G . G G . C . T
B. hermsii GGII		T T T . C . G T T T T G . A . A G T A	. A G A . M A T G . A C A G A A G A C	C C T . C G . G G C C . T
B. miyamotoi	-			
B. coriaceae	-			
B. anserina	-			
B. crocidurae	-			
B. recurrentis	-			
B. burgdorferi	-			
B. afzelii	-			
B. garinii	-			
(E) Organism	qPCF	Ee.16S.40F (5' → 3')	Ehr-spp.16S.83P (5' → 3')	Ech-ee.16S.174R (5' → 3')
E. ewingii	+	C G A A C G A A C A A T T C C T A A A T A G T C T C T	A G A T T C C T A C G C A T T A C T C A C C C G T C T G C	C C A T C A T T T C T A A T G G C T A T T C C A T A C T
E. canis	-			C
E. muris	-	G . T . G C . A . C C . T A G C . T . T .	T	<u>.</u>
E. ruminantium	-			. T A
E. chaffeensis A. phagocytophili	-			
A. marginale	um -			C G
A. ovis	_	G C G A . G C G C A G C . T G		C G
A. centrale	-	G C A . G C G C A G C . T G	T	C G
A. bovis	-	T C . T A G C . W G	T	C C G C . T
R. rickettsii		. A G . A C G C . A T C G G T A T . C T . A A	C T G	. T T . T A A . T
R. typhi	-	. A G . A C G . A C G C . A T C G G T A T . C T . A A		. T T . T A A . T
(F) Organism	qPCI	Ech.16S.64F (5' → 3')	Ehr-spp.16S.83P (5' → 3')	Ech-ee.16S.174R (5' → 3')
E. chaffeensis	+	G A A C G G A C A A T T G C T T A T A A C C T T T T	A G A T T C C T A C G C A T T A C T C A C C C G T C T G C	C C A T C A T T T C T A A T G G C T A T T C C A T A C T
E. canis	-	A T G C . G		C
E. muris	-	T . G C . A . C C G . T	T	
E. ruminantium E. ewingii	-			. T
E. ewingii A. phagocytophili	- um -			
A. marginale	-			C G C
A. ovis	-			C G
A. centrale			T	C G
A. cemruie				
A. bovis	-	T C C G . W . G C .	T	C C G
A. bovis R. rickettsii	-	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$
A. bovis	-	T C C G . W . G C .	T	C C G

	qPCR	Ec.16S.61F (5' → 3')	Ehr-spp.16S.83P (5' → 3')	Ec.16S.148R (5' → 3')
E. canis		G C C T C T G G C T A T A G G - A A A T T G T T A G T	A G A T T C C T A C G C A T T A C T C A C C C G T C T G C	
E. chaffeensis E. muris		A T . T T	T.	. G . A
E. ruminantium		T		. G . A
E. ewingii		A G T C T C T G A C T A T . T A . A T . G		. G . A
A. phagocytophilum	-	T G . A G G . T A - A	T	. G . A
A. marginale		T . G C G C . T G T G	<u>T</u>	. G . A
A. ovis		T . G C G C . T G T G		. G . A
A. centrale A. bovis	-	T . G C G C . T G T G		. G . A
R. rickettsii		. T A A T . G G T G C T C C T . A		. G . A . A A G
R. typhi		T T A A T . A G A T G C T C T . G T . A A	C T G	. G T A . A . A A G G . T
(H) Organism	qP	CR Ap.msp2.420F (5' → 3')	Ap.msp2.452P (5' \rightarrow 3')	Ap.msp2.514R (5' \rightarrow 3')
A. phagocytophilus	m +	G A C T T T C C T A G C A T G G A G T T G G T T	$\hbox{\tt C} \hbox{\tt A} \hbox{\tt T} \hbox{\tt T} \hbox{\tt T} \hbox{\tt C} \hbox{\tt A} \hbox{\tt C} \hbox{\tt C} \hbox{\tt T} \hbox{\tt T} \hbox{\tt A} \hbox{\tt C} \hbox{\tt A} \hbox{\tt C} \hbox{\tt A} \hbox{\tt T} \hbox{\tt G} \hbox{\tt C} \hbox{\tt G} \hbox{\tt C} \hbox{\tt G} \hbox{\tt G}$	$G \ C \ G \ T \ G \ C \ C \ C \ T \ T \ T \ G \ T \ A \ A \ T \ A \ C \ C \ T \ A \ T$
A. marginale	-			
A. ovis	-			
A. centrale	-			
A. bovis	-			
E. chaffeensis				
E. canis E. muris				
E. muris E. ruminantium				
E ewingii				
E. ewingii R. rickettsii				
R. rickettsii R. typhi	- D.C	D. D	Da.b., 73 (500) (51 - 21)	Dulum 7340(AD (5) - 21)
R. rickettsii R. typhi Organism	qPC		Rr.hyp.724788P (5' → 3')	Rr.hyp.724860R (5' \rightarrow 3')
R. rickettsii R. typhi Organism R. rickettsii	qPC			
R. rickettsii R. typhi Organism R. rickettsii R. typhi	+			
R. rickettsii R. typhi (I) Organism R. rickettsii R. typhi A. phagocytophilum	+			
R. rickettsii R. typhi Organism R. rickettsii R. typhi	+			
R. rickettsii R. typhi Organism R. rickettsii R. typhi A. phagocytophilun A. marginale	+			
R. rickettsii R. typhi Organism R. rickettsii R. typhi A. phagocytophilum A. marginale A. ovis	+			
R. rickettsii R. typhi Organism R. rickettsii R. typhi A. phagocytophilum A. marginale A. ovis A. centrale	+			
R. rickettsii R. typhi Organism R. rickettsii R. typhi A. phagocytophilum A. marginale A. ovis A. centrale A. bovis E. chaffeensis E. canis	+			
R. rickettsii R. typhi Organism R. rickettsii A. phagocytophilum A. marginale A. ovis A. centrale A. bovis E. chaffeensis E. canis E. muris	+			
R. rickettsii R. typhi Organism R. rickettsii A. phagocytophilum A. marginale A. ovis A. centrale A. bovis E. chaffeensis E. canis E. muris E. ruminantium	+			
R. rickettsii R. typhi Organism R. rickettsii R. typhi A. phagocytophilun A. marginale A. ovis A. centrale A. bovis E. chaffeensis E. canis E. muris E. ruminantium E. ewingii	+ - - - - - - - - -	A G A G T A A A T C A A C G G A A G A G C A A A A		
R. rickettsii R. typhi R. rickettsii R. typhi A. phagocytophilum A. marginale A. ovis A. centrale A. bovis E. chaffeensis E. canis E. muris E. ruminantium E. ewingti R. akari	+ - - - - - - - - - - - - - - - - - - -	A G A G T A A A T C A A C G G A A G A G C A A A A		
R. rickettsii R. typhi R. rickettsii R. typhi A. phagocytophilum A. marginale A. ovis A. centrale A. bovis E. chaffeensis E. canis E. muris E. ruminantium E. ewingii R. akari R. amblyommii	+ - 77 - - - - - - - - - - - - - - - - -	A G A G T A A A T C A A C G G A A G A G C A A A A		
R. rickettsii R. typhi R. rickettsii R. typhi A. phagocytophilum A. marginale A. ovis A. centrale A. bovis E. chaffeensis E. canis E. muris E. ruminantium E. ewingii R. akari R. amblyommii R. australis	-+	A G A G T A A A T C A A C G G A A G A G C A A A A		
R. rickettsii R. typhi R. rickettsii R. typhi A. phagocytophilum A. marginale A. ovis A. centrale A. bovis E. chaffeensis E. canis E. muris E. ruminantium E. ewingti R. akari R. amblyommii R. australis R. canadensis	- - - - - - - - - - - - - - - - - - -	A G A G T A A A T C A A C G G A A G A G C A A A A		
R. rickettsii R. typhi R. rickettsii R. typhi A. phagocytophilum A. marginale A. ovis A. centrale A. bovis E. chaffeensis E. canis E. muris E. ruminantium E. ewingii R. akari R. amblyommii R. australis R. canadensis R. conorii	-+	A G A G T A A A T C A A C G G A A G A G C A A A A		
R. rickettsii R. typhi R. rickettsii R. typhi A. phagocytophilum A. marginale A. ovis A. centrale A. bovis E. chaffeensis E. canis E. muris E. ruminantium E. ewingii R. akari R. amblyommii R. australis R. canadensis R. canadensis R. conorii R. felis	-++	A G A G T A A A T C A A C G G A A G A G C A A A A		
R. rickettsii R. typhi CI) Organism R. rickettsii R. typhi A. phagocytophilun A. marginale A. ovis A. centrale A. bovis E. chaffeensis E. canis E. muris E. ruminantium E. ewingti R. akari R. amblyommii R. australis R. canadensis R. conorii R. felis R. honei	- - - - - - - - - - - - - - - - - - -	A G A G T A A A T C A A C G G A A G A G C A A A A		
R. rickettsii R. typhi R. rickettsii R. typhi A. phagocytophilum A. marginale A. ovis A. centrale A. bovis E. chaffeensis E. canis E. muris E. ruminantium E. ewingii R. akari R. amblyommii R. australis R. canadensis R. conorii R. felis R. honei R. massiliae	++	A G A G T A A A T C A A C G G A A G A G C A A A A		
R. rickettsii R. typhi R. rickettsii R. typhi A. phagocytophilum A. marginale A. ovis A. centrale A. bovis E. chaffeensis E. canis E. muris E. ruminantium E. ewingii R. akari R. amblyommii R. australis R. canadensis R. conorii R. felis R. honei R. massiliae R. montana	++ +	A G A G T A A A T C A A C G G A A G A G C A A A A		
R. rickettsii R. typhi R. rickettsii R. typhi A. phagocytophilum A. marginale A. ovis A. centrale A. bovis E. chaffeensis E. canis E. muris E. ruminantium E. ewingii R. akari R. amblyommii R. australis R. canadensis R. conorii R. felis R. honei R. massiliae R. montana R. rhipicephali	++	A G A G T A A A T C A A C G G A A G A G C A A A A		
R. rickettsii R. typhi R. rickettsii R. typhi A. phagocytophilum A. marginale A. ovis A. centrale A. bovis E. chaffeensis E. canis E. muris E. ruminantium E. ewingii R. akari R. amblyommii R. australis R. canadensis R. conorii R. felis R. honei R. massiliae R. montana	+ +	A G A G T A A A T C A A C G G A A G A G C A A A A		

(J) Organism	qPCI	Babsp.18S.65-1F / Babsp.18S.67-2F (5' → 3')	Babsp.18S.228P (5' → 3')	Babsp.18S.289R (5' → 3')
B. canis vogel	li +	C G C A T T T A G C G A T G G A C C A	C A T C A G C T T G A C G G T A G G G T A T T G G C C	C C T A A T T C C C C G T T A C C C G T T
B. canis rossi	+	. G C T T T T A G C G A T G G A C C A T T C A		
B. canis canis	+			
B. gibsoni	+			
B. caballi	+	T		
B. odocoilei	+	A . T A . T		
B. divergens	+	A . T T		
B. bigemina	+	T T T		
B. bovis	-	T A T T		
B. microti	-	T G G C G C C G T . T	T T G	C
B. duncani		T G G C T G C C G T T		
B. conradae	-	T G G C T G C C G A A T T	T T G	
T. eqeui	-	T G G C T G C T G T . T	T T G	
C. felis	-	T G G C G C C G T . T	T T G	