



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO - BICOCCA  
Scuola di Scienze  
Dipartimento di Informatica, Sistemistica e Comunicazione  
Corso di Laurea Magistrale in Informatica

## Multiple Sequence Alignment (MSA) di sequenze SARS-CoV2

Alberici Federico - 808058  
Bettini Ivo Junior - 806878  
Traversa Silvia - 816435

Anno Accademico 2019 - 2020

# Indice

|   |          |
|---|----------|
| <b>SARS-CoV-2</b> . . . . .                     | <b>2</b> |
| <b>Obiettivo del progetto</b> . . . . .         | <b>3</b> |
| <b>Sequenze</b> . . . . .                       | <b>3</b> |
| <b>Tool</b> . . . . .                           | <b>3</b> |
| <b>Analisi verticale</b> . . . . .              | <b>4</b> |
| New York (USA) . . . . .                        | 4        |
| Russia . . . . .                                | 4        |
| Italia . . . . .                                | 4        |
| Spagna . . . . .                                | 4        |
| <b>Analisi verticale</b> . . . . .              | <b>4</b> |
| <b>Appendice A - risultati estesi</b> . . . . . | <b>6</b> |
| New York (USA) . . . . .                        | 7        |
| Clustal Omega . . . . .                         | 7        |
| Kalign . . . . .                                | 10       |
| MAFFT . . . . .                                 | 13       |
| Russia . . . . .                                | 15       |
| Clustal Omega . . . . .                         | 15       |
| Kalign . . . . .                                | 18       |
| MAFFT . . . . .                                 | 20       |
| Italia . . . . .                                | 22       |
| Clustal Omega . . . . .                         | 22       |
| Kalign . . . . .                                | 24       |
| MAFFT . . . . .                                 | 26       |
| Spagna . . . . .                                | 28       |
| Clustal Omega . . . . .                         | 28       |
| Kalign . . . . .                                | 32       |
| MAFFT . . . . .                                 | 36       |

## SARS-CoV-2

I coronavirus sono una famiglia di virus RNA a filamento positivo con aspetto simile a una corona se esaminati al microscopio elettronico (da cui il nome) e noti per causare malattie che vanno dal comune raffreddore a patologie più gravi come la Sindrome respiratoria mediorientale (MERS) o la Sindrome respiratoria acuta grave (SARS).

Nel Dicembre 2019 a Wuhan, in Cina, è stato isolato un nuovo ceppo di coronavirus, denominato SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome - Coronavirus - 2*), la cui sequenza virale ha un'omologia del 76% con il virus che causò la pandemia della Sars nel 2002. La malattia respiratoria causata da questo nuovo coronavirus è stata chiamata COVID-19.

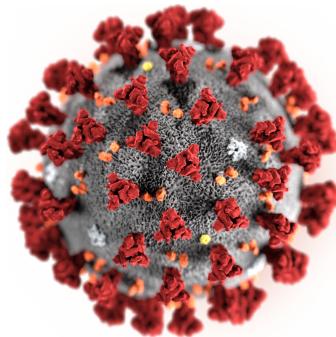


Figure 1: *L'illustrazione, creata dai Centers for Disease Control and Prevention (CDC) statunitense, rivela la morfologia ultrastrutturale del SARS-CoV-2*

Ogni virione (singola particella virale) SARS-CoV-2 ha un diametro di circa 50-200 nanometri. Come altri coronavirus, SARS-CoV-2 presenta quattro proteine strutturali: S (spike), E (inviluppo), M (membrana) e N (nucleocapside). La proteina N contiene il genoma dell'RNA mentre le proteine S, E, M creano insieme l'inviluppo virale. In particolare la proteina spike è quella che permette al virus di attaccarsi alla membrana di una cellula ospite.

Fra le sequenze genomiche SARS-CoV-2 note è stata evidenziata una bassa variabilità, si ritiene dunque che il ceppo sia stato rilevato dalle autorità sanitarie entro poche settimane dalla sua comparsa tra la popolazione umana alla fine del 2019. Dopo il primo caso di infezione noto, avvenuto in Cina verso la fine del 2019, il virus si è diffuso in tutte le province della Cina e in oltre 150 altri paesi in Asia, Europa, Nord America, Sud America, Africa e Oceania. La trasmissione da uomo a uomo di SARS-CoV-2 è stata confermata nel gennaio 2020 e avviene principalmente attraverso goccioline respiratorie da tosse e starnuti entro un raggio di circa 1,8 metri oppure un'altra possibile causa di infezione è il contatto indiretto tramite superfici contaminate.

Il numero di riproduzione di base del virus è stato stimato tra 1.4 e 3.9, il che significa che ogni infezione dal virus dovrebbe causare da 1.4 a 3.9 nuove infezioni nel caso in cui nessun membro della comunità sia immune e non vengano prese misure preventive.

Al 25 maggio 2020, ci sono stati 5.428.605 casi confermati totali di infezione da SARS-CoV-2 nella pandemia in corso, con un totale di decessi attribuiti al virus di 345.375.

## Obiettivo del progetto

L'obiettivo del nostro progetto è riuscire ad allineare le sequenze scaricate (compresa quella che utilizziamo come riferimento per i confronti) con i tool scelti, e produrre in output le variazioni delle sequenze scaricate rispetto alla sequenza di riferimento e creare un'apposita documentazione.

Per poter raggiungere questo obiettivo, abbiamo deciso di dividere la nostra analisi in due parti:

- nella prima parte eseguiamo un'analisi verticale fra la sequenza di riferimento (ossia la prima sequenza che presente nella banca dati raccolta a Wuhan) e delle sequenze prese rispettivamente da Italia, New York, Spagna e Russia. Le sequenze dei singoli paesi sono state prese seguendo un ordine temporale crescente, in modo tale da poter denotare attraverso il confronto delle mutazioni nel tempo.
- nella seconda parte, invece, effettuiamo un confronto orizzontale tra le ultime sequenze raccolte dei vari paesi scelti, in modo da poter individuare la presenza di eventuali mutazioni nello stato corrente del virus, sempre tenendo come riferimento la prima sequenza presente nella banca dati.

## Sequenze

Abbiamo deciso di selezionare alcuni dei paesi con il più alto numero di casi di COVID-19, ossia Stati Uniti (per il quale ci siamo concentrati su uno degli stati a sua volta più colpito, quello di New York), Russia, Spagna e Italia. I casi, al 25 Maggio 2020, sono riportati nella tabella seguente:

|                    |           |
|--------------------|-----------|
| <b>Stati Uniti</b> | 1,678.477 |
| <b>Russia</b>      | 353,427   |
| <b>Spagna</b>      | 235,823   |
| <b>Italia</b>      | 229,858   |

Le sequenze analizzate sono state prese dal sito GISAID. Per ogni paese abbiamo preso solo sequenze complete (con più di 29000 basi) e su pazienti tutti di sesso maschile. Abbiamo cercato inoltre di seguire una linea temporale che partisse dalla prima sequenza presente nel database fino all'ultima, con in mezzo sequenze che si distanziavano tra di loro di una settimana.

## Tool

Tra i tool messi a disposizione abbiamo scelto di utilizzare Clustal Omega, Kalign e MAFFT. Abbiamo scelto Clustal Omega poichè sfrutta il modello probabilistico Profilo HMM (Hidden Markov Model), il quale è in grado di incapsulare i cambiamenti evolutivi che si sono verificati in una serie di sequenze correlate ed inoltre questo tool risultava ottimale per sequenze molto lunghe.

Kalign è stato scelto poichè è un tool che si concentra sulle regioni locali e lavora molto velocemente, motivo per il quale ci sembrava particolarmente adatto per le analisi sui singoli stati che volevamo svolgere.

Infine abbiamo scelto MAFFT poichè attraverso l'algoritmo della trasformata di Fourier veloce

ottimizza gli allineamenti in base alle proprietà fisiche, utilizzando sia un allineamento progressivo che iterativo. Anche esso risulta essere ottimale per sequenze di lunghezza medio-grandi.

## **Analisi verticale**

Nell' analisi verticale abbiamo deciso di studiare singolarmente ogni stato, prendendo le sequenze scelte e confrontandole con quella di riferimento. I risultati ottenuti sono visibile nell'appendice A della relazione.

### **New York (USA)**

Nell'eseguire i tre tool non abbiamo ottenuto risultati differenti nonostante i tre approcci differenti di calcolo.

### **Russia**

La Russia, come New York, nonostante i diversi metodi di calcolo non presenta differenze negli output dei tre tool.

### **Italia**

L'esecuzione dei tre tool con le sequenze dell' Italia ha prodotti output praticamente identici tranne per alcune parti.

Clustal e e Mafft presentano sequenze con variazioni di carattere nelle posizioni 29890 della sequenza 3, 29898 della sequenza 4 e 29899 della sequenza 6.

Per Kalign invece si hanno dei cambi di carattere nella posizione 29879 delle sequenze 3, 4 e 6.

### **Spagna**

Nell'eseguire l'analisi con i tre differenti tool abbiamo ottenuto dei risultati identici tranne nelle ultime due sequenze della Spagna. Mentre Kalign e Mafft producono lo stesso output qualcosa cambia con Clustal.

Nell'output di Clustal, nella sesta sequenza spagnola, troviamo dei cambi di carattere nelle posizioni 5175, 6353, 28882, 29687 e 29733. Per quanto riguarda la sequenza sette, invece, si hanno dei cambi di carattere nelle posizioni 8738, 18743 e 22892.

Con Kalign e Mafft, nella sequenza sei, abbiamo dei cambi di caratteri nelle posizioni 8738, 18743 e 22892. Nella sequenza sette i cambi di carattere sono nelle posizioni 5175, 6353, 28882, 29687 e 29733.

## **Analisi verticale**

Nell'analisi verticale abbiamo, invece, deciso di confrontare le ultime sequenze che erano disponibili con quella di riferimento. Anche questi risultati sono consultabili nell'appendice B della

relazione

Il risultato che abbiamo ottenuto non differisce fra i tre tool, tutte le sequenze hanno subito gli stessi cambiamenti nonostante si trovassero in aree geografiche diverse. Questo risultato ottenuto in base alle sequenze da noi scelte, sottolinea come nonostante il virus sia molto mutevole, questo potrebbero non dipendere dal clima o il luogo in cui si trova.

## **Appendice A - risultati estesi**

## New York (USA)

Clustal Omega

| ID_SEQ               | POS   | LENGTH | REFERENCE   | MUTATION |
|----------------------|-------|--------|---|----------|
| 1_USA—EPI_ISL_420793 | 240   | 1      | C   | T        |
| 1_USA—EPI_ISL_420793 | 1058  | 1      | C   | T        |
| 1_USA—EPI_ISL_420793 | 3036  | 1      | C   | T        |
| 1_USA—EPI_ISL_420793 | 14407 | 1      | C   | T        |
| 1_USA—EPI_ISL_420793 | 23402 | 1      | A   | G        |
| 1_USA—EPI_ISL_420793 | 25562 | 1      | G   | T        |
| 1_USA—EPI_ISL_420793 | 29881 | 21     | AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  |          |
| 2_USA—EPI_ISL_426291 | 0     | 30     | ATTAAGGTTTACCTCCAG<br>GTAACAA   |          |
| 2_USA—EPI_ISL_426291 | 240   | 1      | C   | T        |
| 2_USA—EPI_ISL_426291 | 1058  | 1      | C   | T        |
| 2_USA—EPI_ISL_426291 | 3036  | 1      | C   | T        |
| 2_USA—EPI_ISL_426291 | 8769  | 1      | C   | Y        |
| 2_USA—EPI_ISL_426291 | 14407 | 1      | C   | T        |
| 2_USA—EPI_ISL_426291 | 23402 | 1      | A   | G        |
| 2_USA—EPI_ISL_426291 | 25562 | 1      | G   | T        |
| 2_USA—EPI_ISL_426291 | 29835 | 67     | CCATGTGATTAAAGCTTC<br>TTAGGAGAATGACAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAA   |          |
| 3_USA—EPI_ISL_421365 | 0     | 55     | ATTAAGGTTTACCTCCC<br>AGGTAACAAACCAACCAACT<br>TTCGATCTCTGTA  |          |
| 3_USA—EPI_ISL_421365 | 2675  | 1      | C   | T        |
| 3_USA—EPI_ISL_421365 | 8781  | 1      | C   | T        |
| 3_USA—EPI_ISL_421365 | 22605 | 1      | A   | T        |
| 3_USA—EPI_ISL_421365 | 23524 | 1      | C   | T        |
| 3_USA—EPI_ISL_421365 | 28143 | 1      | T   | C        |
| 3_USA—EPI_ISL_421365 | 28877 | 1      | G   | A        |
| 3_USA—EPI_ISL_421365 | 29741 | 1      | G   | A        |
| 3_USA—EPI_ISL_421365 | 29780 | 122    | AGCTGCCTATGGAGAGCCC<br>TAATGTGAAAATTAAATTAGT<br>AGTGCATCCCCATGTGATTAA<br>ATAGCTTCTTAGGAGAATGACA<br>AAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAA |          |
| 4_USA—EPI_ISL_421594 | 0     | 55     | ATTAAGGTTTACCTCCAG<br>GTAACAAACCAACCAACTTCG<br>ATCTCTGTA  |          |
| 4_USA—EPI_ISL_421594 | 240   | 1      | C   | T        |
| 4_USA—EPI_ISL_421594 | 1058  | 1      | C   | T        |
| 4_USA—EPI_ISL_421594 | 3036  | 1      | C   | T        |
| 4_USA—EPI_ISL_421594 | 14407 | 1      | C   | T        |

|   |     |                |       |     |   |            |
|---|-----|----------------|-------|-----|---|------------|
| 4 | USA | EPI_ISL_421594 | 23125 | 1   | G   | T          |
| 4 | USA | EPI_ISL_421594 | 23402 | 1   | A   | G          |
| 4 | USA | EPI_ISL_421594 | 25562 | 1   | G   | T          |
|   |     |                |       |     | TGAACAATGCTAGGGAGAGC<br>TGCCTATATGGAAGAGCCCTA<br>ATGTGTAAAATTAAATTAGTA<br>GTGCTATCCCCATGTGATTTA<br>ATAGCTTCTTAGGAGAACATGAC<br>AAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAA |            |
| 4 | USA | EPI_ISL_421594 | 29763 | 139 |   |            |
| 5 | USA | EPI_ISL_426309 | 0     | 25  | ATTAAGGTTATACCTTCCCA<br>GGT   |            |
| 5 | USA | EPI_ISL_426309 | 240   | 1   | C   | T          |
| 5 | USA | EPI_ISL_426309 | 1058  | 1   | C   | T          |
| 5 | USA | EPI_ISL_426309 | 3036  | 1   | C   | T          |
| 5 | USA | EPI_ISL_426309 | 14407 | 1   | C   | T          |
| 5 | USA | EPI_ISL_426309 | 23402 | 1   | A   | G          |
| 5 | USA | EPI_ISL_426309 | 25562 | 1   | G   | T          |
| 5 | USA | EPI_ISL_426309 | 29846 | 56  | TAATAGCTCTTAGGAGAACATG<br>ACAAAAAAA<br>AAAAAAA  |            |
| 6 | USA | EPI_ISL_428767 | 0     | 9   | ATTAAGGT  | NNNNNNNN   |
| 6 | USA | EPI_ISL_428767 | 211   | 1   | T   | A          |
| 6 | USA | EPI_ISL_428767 | 232   | 1   | C   | T          |
| 6 | USA | EPI_ISL_428767 | 240   | 1   | C   | T          |
| 6 | USA | EPI_ISL_428767 | 1058  | 1   | C   | T          |
| 6 | USA | EPI_ISL_428767 | 2535  | 1   | C   | T          |
| 6 | USA | EPI_ISL_428767 | 2841  | 1   | C   | T          |
| 6 | USA | EPI_ISL_428767 | 3036  | 1   | C   | T          |
| 6 | USA | EPI_ISL_428767 | 14407 | 1   | C   | T          |
| 6 | USA | EPI_ISL_428767 | 18936 | 1   | G   | A          |
| 6 | USA | EPI_ISL_428767 | 23402 | 1   | A   | G          |
| 6 | USA | EPI_ISL_428767 | 25562 | 1   | G   | T          |
| 7 | USA | EPI_ISL_430418 | 0     | 1   | A   | N          |
| 7 | USA | EPI_ISL_430418 | 240   | 1   | C   | T          |
| 7 | USA | EPI_ISL_430418 | 1058  | 1   | C   | T          |
| 7 | USA | EPI_ISL_430418 | 3036  | 1   | C   | T          |
| 7 | USA | EPI_ISL_430418 | 14407 | 1   | C   | T          |
| 7 | USA | EPI_ISL_430418 | 23402 | 1   | A   | G          |
| 7 | USA | EPI_ISL_430418 | 25562 | 1   | G   | T          |
| 8 | USA | EPI_ISL_435521 | 0     | 10  | ATTAAGGTT   | NNNNNNNNNN |
| 8 | USA | EPI_ISL_435521 | 240   | 1   | C   | T          |
| 8 | USA | EPI_ISL_435521 | 1058  | 1   | C   | T          |
| 8 | USA | EPI_ISL_435521 | 3036  | 1   | C   | T          |
| 8 | USA | EPI_ISL_435521 | 14407 | 1   | C   | T          |

|                      |       |     |  |  |
|----------------------|-------|-----|--|--|
| 8_USA—EPI_ISL_435521 | 15573 | 1   | G  | A  |
| 8_USA—EPI_ISL_435521 | 23402 | 1   | A  | G  |
| 8_USA—EPI_ISL_435521 | 25562 | 1   | G  | T  |
|                      |       |     | ATTAAGGTTTACCTCCC<br>AGGTAACAAACCAACCAACT<br>TTCGATCTCTGTAGATCTGT<br>TCTCTAACGAACCTTAAAAT<br>CTGTGTGGCTGTCACTCGGCT<br>GCATGCTTAGTGCACTCACGC<br>AGTATAATTAA | NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN |
| 9_USA—EPI_ISL_435547 | 0     | 136 |  | NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN   |
| 9_USA—EPI_ISL_435547 | 145   | 3   | ACT  | NNN  |
| 9_USA—EPI_ISL_435547 | 240   | 1   | C  | T  |
| 9_USA—EPI_ISL_435547 | 1058  | 1   | C  | T  |
| 9_USA—EPI_ISL_435547 | 3036  | 1   | C  | T  |
|                      |       |     | CTGACACACGTTATGTGCTCATG<br>GATGGCTCTATTATTCAATTCCCT<br>AACACCTACCTGAAGGTTCTGT<br>TAGAGTGGTAACAACTTTGATT<br>CTGAGTACT                                       | NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN                             |
| 9_USA—EPI_ISL_435547 | 9113  | 102 |  | NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN   |
| 9_USA—EPI_ISL_435547 | 11915 | 1   | C  | T  |
| 9_USA—EPI_ISL_435547 | 14407 | 1   | C  | T  |
| 9_USA—EPI_ISL_435547 | 18997 | 1   | C  | T  |
| 9_USA—EPI_ISL_435547 | 23402 | 1   | A  | G  |
| 9_USA—EPI_ISL_435547 | 25562 | 1   | G  | T  |
| 9_USA—EPI_ISL_435547 | 27058 | 1   | C  | T  |
| 9_USA—EPI_ISL_435547 | 29539 | 1   | G  | A  |
| 9_USA—EPI_ISL_435547 | 29901 | 1   | A  | N  |

| ID_SEQ               | POS   | LENGTH | REFERENCE   | MUTATION |
|----------------------|-------|--------|---|----------|
| 1_USA—EPI_ISL_420793 | 240   | 1      | C   | T        |
| 1_USA—EPI_ISL_420793 | 1058  | 1      | C   | T        |
| 1_USA—EPI_ISL_420793 | 3036  | 1      | C   | T        |
| 1_USA—EPI_ISL_420793 | 14407 | 1      | C   | T        |
| 1_USA—EPI_ISL_420793 | 23402 | 1      | A   | G        |
| 1_USA—EPI_ISL_420793 | 25562 | 1      | G   | T        |
| 1_USA—EPI_ISL_420793 | 29881 | 21     | AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  | —————    |
| 2_USA—EPI_ISL_426291 | 0     | 30     | ATTAAAGGTTTACCTTCCCAG<br>GTAACAA  | —————    |
| 2_USA—EPI_ISL_426291 | 240   | 1      | C   | T        |
| 2_USA—EPI_ISL_426291 | 1058  | 1      | C   | T        |
| 2_USA—EPI_ISL_426291 | 3036  | 1      | C   | T        |
| 2_USA—EPI_ISL_426291 | 8769  | 1      | C   | Y        |
| 2_USA—EPI_ISL_426291 | 14407 | 1      | C   | T        |
| 2_USA—EPI_ISL_426291 | 23402 | 1      | A   | G        |
| 2_USA—EPI_ISL_426291 | 25562 | 1      | G   | T        |
| 2_USA—EPI_ISL_426291 | 29835 | 67     | CCATGTGATTTAACAGCTCTTAG<br>GAGAATGACAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAA   | —————    |
| 3_USA—EPI_ISL_421365 | 0     | 55     | ATTAAAGGTTTACCTTCCCAGGT<br>ACAAACCAACCAACTTCGATCTCTT<br>GTA   | —————    |
| 3_USA—EPI_ISL_421365 | 2675  | 1      | C   | T        |
| 3_USA—EPI_ISL_421365 | 8781  | 1      | C   | T        |
| 3_USA—EPI_ISL_421365 | 22605 | 1      | A   | T        |
| 3_USA—EPI_ISL_421365 | 23524 | 1      | C   | T        |
| 3_USA—EPI_ISL_421365 | 28143 | 1      | T   | C        |
| 3_USA—EPI_ISL_421365 | 28877 | 1      | G   | A        |
| 3_USA—EPI_ISL_421365 | 29741 | 1      | G   | A        |
| 3_USA—EPI_ISL_421365 | 29780 | 122    | AGCTGCCTATGGAAAGAGCC<br>CTAATGTGAAATTAAATTAA<br>GTAGTGCTATCCCCATGTGATT<br>TTAATAGCTTCTAGGAGAATG<br>ACAAAAAAA<br>AAAAAAA | —————    |
| 4_USA—EPI_ISL_421594 | 0     | 55     | ATTAAAGGTTTACCTTCCC<br>GGTAACAAACCAACCAACTTT<br>CGATCTCTGTA   | —————    |
| 4_USA—EPI_ISL_421594 | 240   | 1      | C   | T        |
| 4_USA—EPI_ISL_421594 | 1058  | 1      | C   | T        |
| 4_USA—EPI_ISL_421594 | 3036  | 1      | C   | T        |
| 4_USA—EPI_ISL_421594 | 14407 | 1      | C   | T        |
| 4_USA—EPI_ISL_421594 | 23125 | 1      | G   | T        |
| 4_USA—EPI_ISL_421594 | 23402 | 1      | A   | G        |

|                      |       |     |   |            |
|----------------------|-------|-----|---|------------|
| 4_USA—EPI_ISL_421594 | 25562 | 1   | G   | T          |
|                      |       |     | TGAACAATGCTAGGGAGAGCTG<br>CCTATATGGAAGAGGCCCTAATGT<br>GTAAAATTAAATTAGTAGTGCTA<br>TCCCCATGTGATTAAATAGCTTC<br>TTAGGAGAATGACAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAA | _____      |
| 4_USA—EPI_ISL_421594 | 29763 | 139 |   | _____      |
| 5_USA—EPI_ISL_426309 | 0     | 25  | ATTAAGGTTATACCTCCAGGT   | _____      |
| 5_USA—EPI_ISL_426309 | 240   | 1   | C   | T          |
| 5_USA—EPI_ISL_426309 | 1058  | 1   | C   | T          |
| 5_USA—EPI_ISL_426309 | 3036  | 1   | C   | T          |
| 5_USA—EPI_ISL_426309 | 14407 | 1   | C   | T          |
| 5_USA—EPI_ISL_426309 | 23402 | 1   | A   | G          |
| 5_USA—EPI_ISL_426309 | 25562 | 1   | G   | T          |
| 5_USA—EPI_ISL_426309 | 29846 | 56  | TAATAGCTCTTAGGAGAAC<br>CAAAAAAAA<br>AAAAAAA   | _____      |
| 6_USA—EPI_ISL_428767 | 0     | 9   | ATTAAGGT  | NNNNNNNNN  |
| 6_USA—EPI_ISL_428767 | 211   | 1   | T   | A          |
| 6_USA—EPI_ISL_428767 | 232   | 1   | C   | T          |
| 6_USA—EPI_ISL_428767 | 240   | 1   | C   | T          |
| 6_USA—EPI_ISL_428767 | 1058  | 1   | C   | T          |
| 6_USA—EPI_ISL_428767 | 2535  | 1   | C   | T          |
| 6_USA—EPI_ISL_428767 | 2841  | 1   | C   | T          |
| 6_USA—EPI_ISL_428767 | 3036  | 1   | C   | T          |
| 6_USA—EPI_ISL_428767 | 14407 | 1   | C   | T          |
| 6_USA—EPI_ISL_428767 | 18936 | 1   | G   | A          |
| 6_USA—EPI_ISL_428767 | 23402 | 1   | A   | G          |
| 6_USA—EPI_ISL_428767 | 25562 | 1   | G   | T          |
| 7_USA—EPI_ISL_430418 | 0     | 1   | A   | N          |
| 7_USA—EPI_ISL_430418 | 240   | 1   | C   | T          |
| 7_USA—EPI_ISL_430418 | 1058  | 1   | C   | T          |
| 7_USA—EPI_ISL_430418 | 3036  | 1   | C   | T          |
| 7_USA—EPI_ISL_430418 | 14407 | 1   | C   | T          |
| 7_USA—EPI_ISL_430418 | 23402 | 1   | A   | G          |
| 7_USA—EPI_ISL_430418 | 25562 | 1   | G   | T          |
| 8_USA—EPI_ISL_435521 | 0     | 10  | ATTAAGGTT   | NNNNNNNNNN |
| 8_USA—EPI_ISL_435521 | 240   | 1   | C   | T          |
| 8_USA—EPI_ISL_435521 | 1058  | 1   | C   | T          |
| 8_USA—EPI_ISL_435521 | 3036  | 1   | C   | T          |
| 8_USA—EPI_ISL_435521 | 14407 | 1   | C   | T          |
| 8_USA—EPI_ISL_435521 | 15573 | 1   | G   | A          |
| 8_USA—EPI_ISL_435521 | 23402 | 1   | A   | G          |

|                      |       |     |  |  |
|----------------------|-------|-----|--|--|
| 8_USA—EPI_ISL_435521 | 25562 | 1   | G  | T  |
|                      |       |     | ATTAAGGTTATAACCTCCC<br>AGGTAACAAACCAACCAACT<br>TTCGATCTCTGTAGATCTGTT<br>CTCTAACGAACCTTAAAATC<br>TGTGTGGCTGTCACTCGGCTG<br>CATGCTTAGTGCACTCACGCA<br>GTATAATTAA | NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN |
| 9_USA—EPI_ISL_435547 | 0     | 136 |  |  |
| 9_USA—EPI_ISL_435547 | 145   | 3   | ACT  | NNN  |
| 9_USA—EPI_ISL_435547 | 240   | 1   | C  | T  |
| 9_USA—EPI_ISL_435547 | 1058  | 1   | C  | T  |
| 9_USA—EPI_ISL_435547 | 3036  | 1   | C  | T  |
| 9_USA—EPI_ISL_435547 | 9113  | 102 | CTGACACACGTTATGTGCTC<br>ATGGATGGCTCTATTATTCAA<br>TTTCCTAACACACCTACCTGAA<br>GGTTCTGTTAGAGTGGTAACA<br>ACTTTGATTCTGAGTACT                                       | NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN   |
| 9_USA—EPI_ISL_435547 | 11915 | 1   | C  | T  |
| 9_USA—EPI_ISL_435547 | 14407 | 1   | C  | T  |
| 9_USA—EPI_ISL_435547 | 18997 | 1   | C  | T  |
| 9_USA—EPI_ISL_435547 | 23402 | 1   | A  | G  |
| 9_USA—EPI_ISL_435547 | 25562 | 1   | G  | T  |
| 9_USA—EPI_ISL_435547 | 27058 | 1   | C  | T  |
| 9_USA—EPI_ISL_435547 | 29539 | 1   | G  | A  |
| 9_USA—EPI_ISL_435547 | 29901 | 1   | A  | N  |

## MAFFT

| ID_SEQ               | POS   | LENGTH | REFERENCE  | MUTATION                                  |
|----------------------|-------|--------|--|---|
| 1_USA—EPI_ISL_420793 | 240   | 1      | C  | T   |
| 1_USA—EPI_ISL_420793 | 1058  | 1      | C  | T   |
| 1_USA—EPI_ISL_420793 | 3036  | 1      | C  | T   |
| 1_USA—EPI_ISL_420793 | 14407 | 1      | C  | T   |
| 1_USA—EPI_ISL_420793 | 23402 | 1      | A  | G   |
| 1_USA—EPI_ISL_420793 | 25562 | 1      | G  | T   |
| 1_USA—EPI_ISL_420793 | 29881 | 21     | AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA   | —————                                     |
| 2_USA—EPI_ISL_426291 | 0     | 30     | ATTAAAGGTTATACCTTCCCAG<br>GTAACAA  | —————                                     |
| 2_USA—EPI_ISL_426291 | 240   | 1      | C  | T   |
| 2_USA—EPI_ISL_426291 | 1058  | 1      | C  | T   |
| 2_USA—EPI_ISL_426291 | 3036  | 1      | C  | T   |
| 2_USA—EPI_ISL_426291 | 8769  | 1      | C  | Y   |
| 2_USA—EPI_ISL_426291 | 14407 | 1      | C  | T   |
| 2_USA—EPI_ISL_426291 | 23402 | 1      | A  | G   |
| 2_USA—EPI_ISL_426291 | 25562 | 1      | G  | T   |
| 2_USA—EPI_ISL_426291 | 29835 | 67     | CCATGTGATTTAATAGCTTC<br>TTAGGAGAACATGACAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAA   | —————<br>—————<br>—————<br>——             |
| 3_USA—EPI_ISL_421365 | 0     | 55     | ATTAAAGGTTATACCTTCCC<br>AGGTAACAAACCAACCAACTT<br>TCGATCTCTTGTA   | —————<br>—————<br>—————                   |
| 3_USA—EPI_ISL_421365 | 2675  | 1      | C  | T   |
| 3_USA—EPI_ISL_421365 | 8781  | 1      | C  | T   |
| 3_USA—EPI_ISL_421365 | 22605 | 1      | A  | T   |
| 3_USA—EPI_ISL_421365 | 23524 | 1      | C  | T   |
| 3_USA—EPI_ISL_421365 | 28143 | 1      | T  | C   |
| 3_USA—EPI_ISL_421365 | 28877 | 1      | G  | A   |
| 3_USA—EPI_ISL_421365 | 29741 | 1      | G  | A   |
| 3_USA—EPI_ISL_421365 | 29780 | 122    | AGCTGCCTATATGGAAGAGCC<br>CTAATGTGAAATTAATTAA<br>GTAGTGCTATCCCCATGTGATT<br>TTAATAGCTTCTTAGGAGAATG<br>ACAAAAAAA<br>AAAAAAA | —————<br>—————<br>—————<br>—————<br>————— |
| 4_USA—EPI_ISL_421594 | 0     | 55     | ATTAAAGGTTATACCTTCCC<br>GGTAACAAACCAACCAACTT<br>CGATCTCTTGTA   | —————<br>—————<br>—————                   |
| 4_USA—EPI_ISL_421594 | 240   | 1      | C  | T   |
| 4_USA—EPI_ISL_421594 | 1058  | 1      | C  | T   |
| 4_USA—EPI_ISL_421594 | 3036  | 1      | C  | T   |
| 4_USA—EPI_ISL_421594 | 14407 | 1      | C  | T   |
| 4_USA—EPI_ISL_421594 | 23125 | 1      | G  | T   |

|                      |       |     |   |            |
|----------------------|-------|-----|---|------------|
| 4_USA—EPI_ISL_421594 | 23402 | 1   | A   | G          |
| 4_USA—EPI_ISL_421594 | 25562 | 1   | G   | T          |
| 4_USA—EPI_ISL_421594 | 29763 | 139 | TGAACAAATGCTAGGGAGAGC<br>TGCCTATATGGAAGAGCCCTA<br>ATGTGTAAAATTAAATTTAGTA<br>GTGCTATCCCCATGTGATTTA<br>ATAGCTTCTTAGGAGAATGAC<br>AAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAA | _____      |
| 5_USA—EPI_ISL_426309 | 0     | 25  | ATTAAAGGTTATACCTTCCA<br>GGT   | _____      |
| 5_USA—EPI_ISL_426309 | 240   | 1   | C   | T          |
| 5_USA—EPI_ISL_426309 | 1058  | 1   | C   | T          |
| 5_USA—EPI_ISL_426309 | 3036  | 1   | C   | T          |
| 5_USA—EPI_ISL_426309 | 14407 | 1   | C   | T          |
| 5_USA—EPI_ISL_426309 | 23402 | 1   | A   | G          |
| 5_USA—EPI_ISL_426309 | 25562 | 1   | G   | T          |
| 5_USA—EPI_ISL_426309 | 29846 | 56  | TAATAGCTCTTAGGAGAATG<br>ACAAAAAAA<br>AAAAAAA  | _____      |
| 6_USA—EPI_ISL_428767 | 0     | 9   | ATTAAAGGT   | NNNNNNNNN  |
| 6_USA—EPI_ISL_428767 | 211   | 1   | T   | A          |
| 6_USA—EPI_ISL_428767 | 232   | 1   | C   | T          |
| 6_USA—EPI_ISL_428767 | 240   | 1   | C   | T          |
| 6_USA—EPI_ISL_428767 | 1058  | 1   | C   | T          |
| 6_USA—EPI_ISL_428767 | 2535  | 1   | C   | T          |
| 6_USA—EPI_ISL_428767 | 2841  | 1   | C   | T          |
| 6_USA—EPI_ISL_428767 | 3036  | 1   | C   | T          |
| 6_USA—EPI_ISL_428767 | 14407 | 1   | C   | T          |
| 6_USA—EPI_ISL_428767 | 18936 | 1   | G   | A          |
| 6_USA—EPI_ISL_428767 | 23402 | 1   | A   | G          |
| 6_USA—EPI_ISL_428767 | 25562 | 1   | G   | T          |
| 7_USA—EPI_ISL_430418 | 0     | 1   | A   | N          |
| 7_USA—EPI_ISL_430418 | 240   | 1   | C   | T          |
| 7_USA—EPI_ISL_430418 | 1058  | 1   | C   | T          |
| 7_USA—EPI_ISL_430418 | 3036  | 1   | C   | T          |
| 7_USA—EPI_ISL_430418 | 14407 | 1   | C   | T          |
| 7_USA—EPI_ISL_430418 | 23402 | 1   | A   | G          |
| 7_USA—EPI_ISL_430418 | 25562 | 1   | G   | T          |
| 8_USA—EPI_ISL_435521 | 0     | 10  | ATTAAAGGTT  | NNNNNNNNNN |
| 8_USA—EPI_ISL_435521 | 240   | 1   | C   | T          |
| 8_USA—EPI_ISL_435521 | 1058  | 1   | C   | T          |
| 8_USA—EPI_ISL_435521 | 3036  | 1   | C   | T          |
| 8_USA—EPI_ISL_435521 | 14407 | 1   | C   | T          |
| 8_USA—EPI_ISL_435521 | 15573 | 1   | G   | A          |

|                      |       |     |  |  |
|----------------------|-------|-----|--|--|
| 8_USA—EPI_ISL_435521 | 23402 | 1   | A  | G  |
| 8_USA—EPI_ISL_435521 | 25562 | 1   | G  | T  |
| 9_USA—EPI_ISL_435547 | 0     | 136 | ATTAAAGGTTTATAACCTTCCC<br>AGGTAAACAAACCAACCAAC<br>TTTCGATCTCTTAGATCTG<br>TTCTCTAACGAACCTTAAA<br>TCTGTGTGGCTGTCACTCGGC<br>TGCATGCTTAGTGCACTCACG<br>CAGTATAATTAA | NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN |
| 9_USA—EPI_ISL_435547 | 145   | 3   | ACT  | NNN  |
| 9_USA—EPI_ISL_435547 | 240   | 1   | C  | T  |
| 9_USA—EPI_ISL_435547 | 1058  | 1   | C  | T  |
| 9_USA—EPI_ISL_435547 | 3036  | 1   | C  | T  |
| 9_USA—EPI_ISL_435547 | 9113  | 102 | CTGACACACGTTATGTGCTCA<br>TGGATGGCTCTATTATTCAATT<br>TCCTAACACACCTACCTTGAAGG<br>TTCTGTTAGAGTGGTAACAAAC<br>TTTGATTCTGAGTACT                                       | NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN   |
| 9_USA—EPI_ISL_435547 | 11915 | 1   | C  | T  |
| 9_USA—EPI_ISL_435547 | 14407 | 1   | C  | T  |
| 9_USA—EPI_ISL_435547 | 18997 | 1   | C  | T  |
| 9_USA—EPI_ISL_435547 | 23402 | 1   | A  | G  |
| 9_USA—EPI_ISL_435547 | 25562 | 1   | G  | T  |
| 9_USA—EPI_ISL_435547 | 27058 | 1   | C  | T  |
| 9_USA—EPI_ISL_435547 | 29539 | 1   | G  | A  |
| 9_USA—EPI_ISL_435547 | 29901 | 1   | A  | N  |

## Russia

Clustal Omega

| ID_SEQ                  | POS   | LENGTH | REFERENCE | MUTATION |
|-------------------------|-------|--------|-----------|----------|
| 1_Russia—EPI_ISL_428860 | 240   | 1      | C         | T        |
| 1_Russia—EPI_ISL_428860 | 3036  | 1      | C         | T        |
| 1_Russia—EPI_ISL_428860 | 14407 | 1      | C         | T        |
| 1_Russia—EPI_ISL_428860 | 18567 | 1      | C         | T        |
| 1_Russia—EPI_ISL_428860 | 23402 | 1      | A         | G        |
| 1_Russia—EPI_ISL_428860 | 26529 | 1      | A         | G        |
| 2_Russia—EPI_ISL_421275 | 240   | 1      | C         | T        |
| 2_Russia—EPI_ISL_421275 | 3036  | 1      | C         | T        |
| 2_Russia—EPI_ISL_421275 | 4001  | 1      | C         | T        |
| 2_Russia—EPI_ISL_421275 | 10096 | 1      | G         | A        |
| 2_Russia—EPI_ISL_421275 | 11082 | 1      | G         | T        |
| 2_Russia—EPI_ISL_421275 | 13535 | 1      | C         | T        |
| 2_Russia—EPI_ISL_421275 | 14407 | 1      | C         | T        |
| 2_Russia—EPI_ISL_421275 | 23402 | 1      | A         | G        |
| 2_Russia—EPI_ISL_421275 | 23730 | 1      | C         | T        |

|                         |       |     |   |  |
|-------------------------|-------|-----|---|--|
| 2_Russia—EPI_ISL_421275 | 27405 | 1   | C   | T  |
| 2_Russia—EPI_ISL_421275 | 28880 | 3   | GGG   | AAC  |
| 2_Russia—EPI_ISL_421275 | 29890 | 12  | AAAAAAAAAAAAAA  | ————   |
| 3_Russia—EPI_ISL_427337 | 240   | 1   | C   | T  |
| 3_Russia—EPI_ISL_427337 | 3036  | 1   | C   | T  |
| 3_Russia—EPI_ISL_427337 | 14407 | 1   | C   | T  |
| 3_Russia—EPI_ISL_427337 | 23402 | 1   | A   | G  |
| 4_Russia—EPI_ISL_428852 | 240   | 1   | C   | T  |
| 4_Russia—EPI_ISL_428852 | 3036  | 1   | C   | T  |
| 4_Russia—EPI_ISL_428852 | 10968 | 1   | C   | T  |
| 4_Russia—EPI_ISL_428852 | 14407 | 1   | C   | T  |
| 4_Russia—EPI_ISL_428852 | 23402 | 1   | A   | G  |
| 4_Russia—EPI_ISL_428852 | 28880 | 3   | GGG   | AAC  |
| 5_Russia—EPI_ISL_427334 | 0     | 8   | ATTAAAGG  | NNNNNNNN   |
| 5_Russia—EPI_ISL_427334 | 75    | 180 | TTTAAAATCTGTGTGGCTGT<br>CACTCGGCTGCATGCTTAGT<br>GCACTCACCGCAGTATAATT<br>ATAACTAATTACTGTCGTTG<br>ACAGGACACGAGTAACTCGT<br>CTATCTTCTGCAGGCTGCTTA<br>CGGTTTGTCCGTGTTGCAG<br>CCGATCATCAGCACATCTAGG<br>TTTCGTCCGGGTGTGACC | NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN |
| 5_Russia—EPI_ISL_427334 | 3036  | 1   | C   | T  |
| 5_Russia—EPI_ISL_427334 | 14407 | 1   | C   | T  |
| 5_Russia—EPI_ISL_427334 | 23402 | 1   | A   | G  |
| 5_Russia—EPI_ISL_427334 | 26749 | 1   | C   | T  |
| 5_Russia—EPI_ISL_427334 | 28880 | 3   | GGG   | AAC  |
| 5_Russia—EPI_ISL_427334 | 29866 | 36  | GACAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAA   | NNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNN   |
| 6_Russia—EPI_ISL_430096 | 0     | 8   | ATTAAAGG  | NNNNNNNN   |
| 6_Russia—EPI_ISL_430096 | 240   | 1   | C   | T  |
| 6_Russia—EPI_ISL_430096 | 3036  | 1   | C   | T  |
| 6_Russia—EPI_ISL_430096 | 14407 | 1   | C   | T  |
| 6_Russia—EPI_ISL_430096 | 23402 | 1   | A   | G  |
| 6_Russia—EPI_ISL_430096 | 26749 | 1   | C   | T  |
| 6_Russia—EPI_ISL_430096 | 28880 | 3   | GGG   | AAC  |
| 6_Russia—EPI_ISL_430096 | 29872 | 30  | AAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAA  | NNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNN   |
| 7_Russia—EPI_ISL_430108 | 240   | 1   | C   | T  |
| 7_Russia—EPI_ISL_430108 | 834   | 1   | C   | T  |
| 7_Russia—EPI_ISL_430108 | 3036  | 1   | C   | T  |
| 7_Russia—EPI_ISL_430108 | 14407 | 1   | C   | T  |
| 7_Russia—EPI_ISL_430108 | 20267 | 1   | A   | G  |

|                         |       |    |  |                                       |
|-------------------------|-------|----|--|---------------------------------------|
| 7_Russia—EPI_ISL_430108 | 23402 | 1  | A  | G                                     |
| 7_Russia—EPI_ISL_430108 | 29870 | 32 | AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAA | NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNN |

| ID_SEQ                  | PO    | LENGTH | REFERENCE   | MUTATION   |
|-------------------------|-------|--------|---|--|
| 1_Russia—EPI_ISL_428860 | 240   | 1      | C   | T  |
| 1_Russia—EPI_ISL_428860 | 3036  | 1      | C   | T  |
| 1_Russia—EPI_ISL_428860 | 14407 | 1      | C   | T  |
| 1_Russia—EPI_ISL_428860 | 18567 | 1      | C   | T  |
| 1_Russia—EPI_ISL_428860 | 23402 | 1      | A   | G  |
| 1_Russia—EPI_ISL_428860 | 26529 | 1      | A   | G  |
| 2_Russia—EPI_ISL_421275 | 240   | 1      | C   | T  |
| 2_Russia—EPI_ISL_421275 | 3036  | 1      | C   | T  |
| 2_Russia—EPI_ISL_421275 | 4001  | 1      | C   | T  |
| 2_Russia—EPI_ISL_421275 | 10096 | 1      | G   | A  |
| 2_Russia—EPI_ISL_421275 | 11082 | 1      | G   | T  |
| 2_Russia—EPI_ISL_421275 | 13535 | 1      | C   | T  |
| 2_Russia—EPI_ISL_421275 | 14407 | 1      | C   | T  |
| 2_Russia—EPI_ISL_421275 | 23402 | 1      | A   | G  |
| 2_Russia—EPI_ISL_421275 | 23730 | 1      | C   | T  |
| 2_Russia—EPI_ISL_421275 | 27405 | 1      | C   | T  |
| 2_Russia—EPI_ISL_421275 | 28880 | 3      | GGG   | AAC  |
| 2_Russia—EPI_ISL_421275 | 29890 | 12     | AAAAAAAAAAAA  | _____  |
| 3_Russia—EPI_ISL_427337 | 240   | 1      | C   | T  |
| 3_Russia—EPI_ISL_427337 | 3036  | 1      | C   | T  |
| 3_Russia—EPI_ISL_427337 | 14407 | 1      | C   | T  |
| 3_Russia—EPI_ISL_427337 | 23402 | 1      | A   | G  |
| 4_Russia—EPI_ISL_428852 | 240   | 1      | C   | T  |
| 4_Russia—EPI_ISL_428852 | 3036  | 1      | C   | T  |
| 4_Russia—EPI_ISL_428852 | 10968 | 1      | C   | T  |
| 4_Russia—EPI_ISL_428852 | 14407 | 1      | C   | T  |
| 4_Russia—EPI_ISL_428852 | 23402 | 1      | A   | G  |
| 4_Russia—EPI_ISL_428852 | 28880 | 3      | GGG   | AAC  |
| 5_Russia—EPI_ISL_427334 | 0     | 8      | ATTAAAGG  | NNNNNNNN   |
| 5_Russia—EPI_ISL_427334 | 75    | 180    | TTTAAATCTGTGTGGCTGT<br>CACTCGGCTGCATGCTTAGT<br>GCACTCACGCAGTATAATTA<br>ATAACTAATTACTGTCGTG<br>ACAGGACACGAGTAACTCG<br>TCTATCTCTGCAGGCTGCT<br>TACGGTTCGTCCGTGTTGC<br>AGCCGATCATCAGCACATCT<br>AGGTTTCGTCGGGTGTGACC | NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN |
| 5_Russia—EPI_ISL_427334 | 3036  | 1      | C   | T  |
| 5_Russia—EPI_ISL_427334 | 14407 | 1      | C   | T  |
| 5_Russia—EPI_ISL_427334 | 23402 | 1      | A   | G  |
| 5_Russia—EPI_ISL_427334 | 26749 | 1      | C   | T  |

|                         |       |    |                            |  |
|-------------------------|-------|----|----------------------------|--|
| 5_Russia—EPI_ISL_427334 | 28880 | 3  | GGG                        | AAC                                    |
| 5_Russia—EPI_ISL_427334 | 29866 | 36 | GACAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAA | NNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNN |
| 6_Russia—EPI_ISL_430096 | 0     | 8  | ATTAAAGG                   | NNNNNNNN                               |
| 6_Russia—EPI_ISL_430096 | 240   | 1  | C                          | T                                      |
| 6_Russia—EPI_ISL_430096 | 3036  | 1  | C                          | T                                      |
| 6_Russia—EPI_ISL_430096 | 14407 | 1  | C                          | T                                      |
| 6_Russia—EPI_ISL_430096 | 23402 | 1  | A                          | G                                      |
| 6_Russia—EPI_ISL_430096 | 26749 | 1  | C                          | T                                      |
| 6_Russia—EPI_ISL_430096 | 28880 | 3  | GGG                        | AAC                                    |
| 6_Russia—EPI_ISL_430096 | 29872 | 30 | AAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAA   | NNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNN         |
| 7_Russia—EPI_ISL_430108 | 240   | 1  | C                          | T                                      |
| 7_Russia—EPI_ISL_430108 | 834   | 1  | C                          | T                                      |
| 7_Russia—EPI_ISL_430108 | 3036  | 1  | C                          | T                                      |
| 7_Russia—EPI_ISL_430108 | 14407 | 1  | C                          | T                                      |
| 7_Russia—EPI_ISL_430108 | 20267 | 1  | A                          | G                                      |
| 7_Russia—EPI_ISL_430108 | 23402 | 1  | A                          | G                                      |
| 7_Russia—EPI_ISL_430108 | 29870 | 32 | AAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAA   | NNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNN     |

| ID_SEQ                  | POS   | LENGTH | REFERENCE   | MUTATION   |
|-------------------------|-------|--------|---|--|
| 1_Russia—EPI_ISL_428860 | 240   | 1      | C   | T  |
| 1_Russia—EPI_ISL_428860 | 3036  | 1      | C   | T  |
| 1_Russia—EPI_ISL_428860 | 14407 | 1      | C   | T  |
| 1_Russia—EPI_ISL_428860 | 18567 | 1      | C   | T  |
| 1_Russia—EPI_ISL_428860 | 23402 | 1      | A   | G  |
| 1_Russia—EPI_ISL_428860 | 26529 | 1      | A   | G  |
| 2_Russia—EPI_ISL_421275 | 240   | 1      | C   | T  |
| 2_Russia—EPI_ISL_421275 | 3036  | 1      | C   | T  |
| 2_Russia—EPI_ISL_421275 | 4001  | 1      | C   | T  |
| 2_Russia—EPI_ISL_421275 | 10096 | 1      | G   | A  |
| 2_Russia—EPI_ISL_421275 | 11082 | 1      | G   | T  |
| 2_Russia—EPI_ISL_421275 | 13535 | 1      | C   | T  |
| 2_Russia—EPI_ISL_421275 | 14407 | 1      | C   | T  |
| 2_Russia—EPI_ISL_421275 | 23402 | 1      | A   | G  |
| 2_Russia—EPI_ISL_421275 | 23730 | 1      | C   | T  |
| 2_Russia—EPI_ISL_421275 | 27405 | 1      | C   | T  |
| 2_Russia—EPI_ISL_421275 | 28880 | 3      | GGG   | AAC  |
| 2_Russia—EPI_ISL_421275 | 29890 | 12     | AAAAAAAAAAAA  | ————   |
| 3_Russia—EPI_ISL_427337 | 240   | 1      | C   | T  |
| 3_Russia—EPI_ISL_427337 | 3036  | 1      | C   | T  |
| 3_Russia—EPI_ISL_427337 | 14407 | 1      | C   | T  |
| 3_Russia—EPI_ISL_427337 | 23402 | 1      | A   | G  |
| 4_Russia—EPI_ISL_428852 | 240   | 1      | C   | T  |
| 4_Russia—EPI_ISL_428852 | 3036  | 1      | C   | T  |
| 4_Russia—EPI_ISL_428852 | 10968 | 1      | C   | T  |
| 4_Russia—EPI_ISL_428852 | 14407 | 1      | C   | T  |
| 4_Russia—EPI_ISL_428852 | 23402 | 1      | A   | G  |
| 4_Russia—EPI_ISL_428852 | 28880 | 3      | GGG   | AAC  |
| 5_Russia—EPI_ISL_427334 | 0     | 8      | ATTAAAGG  | NNNNNNNN   |
| 5_Russia—EPI_ISL_427334 | 75    | 180    | TTTAAATCTGTGGCTGTC<br>ACTCGGCTGCATGCTTAGTGC<br>ACTCACGCAGTATAATTAA<br>CTAATTACTGTCGTTGACAGGA<br>CACGAGTAACTCGTCTATCTC<br>TGCAGGCTGCTTACGGTTCGT<br>CCGTGTTGCAGCCGATCATCAG<br>CACATCTAGGTTCGTCCGGGT<br>GTGACC | NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN |
| 5_Russia—EPI_ISL_427334 | 3036  | 1      | C   | T  |
| 5_Russia—EPI_ISL_427334 | 14407 | 1      | C   | T  |
| 5_Russia—EPI_ISL_427334 | 23402 | 1      | A   | G  |
| 5_Russia—EPI_ISL_427334 | 26749 | 1      | C   | T  |
| 5_Russia—EPI_ISL_427334 | 28880 | 3      | GGG   | AAC  |

|                         |       |    |                               |                                      |
|-------------------------|-------|----|-------------------------------|--------------------------------------|
| 5_Russia—EPI_ISL_427334 | 29866 | 36 | GACAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAA | NNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNN |
| 6_Russia—EPI_ISL_430096 | 0     | 8  | ATTAAAGG                      | NNNNNNNN                             |
| 6_Russia—EPI_ISL_430096 | 240   | 1  | C                             | T                                    |
| 6_Russia—EPI_ISL_430096 | 3036  | 1  | C                             | T                                    |
| 6_Russia—EPI_ISL_430096 | 14407 | 1  | C                             | T                                    |
| 6_Russia—EPI_ISL_430096 | 23402 | 1  | A                             | G                                    |
| 6_Russia—EPI_ISL_430096 | 26749 | 1  | C                             | T                                    |
| 6_Russia—EPI_ISL_430096 | 28880 | 3  | GGG                           | AAC                                  |
| 6_Russia—EPI_ISL_430096 | 29872 | 30 | AAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAA    | NNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNN       |
| 7_Russia—EPI_ISL_430108 | 240   | 1  | C                             | T                                    |
| 7_Russia—EPI_ISL_430108 | 834   | 1  | C                             | T                                    |
| 7_Russia—EPI_ISL_430108 | 3036  | 1  | C                             | T                                    |
| 7_Russia—EPI_ISL_430108 | 14407 | 1  | C                             | T                                    |
| 7_Russia—EPI_ISL_430108 | 20267 | 1  | A                             | G                                    |
| 7_Russia—EPI_ISL_430108 | 23402 | 1  | A                             | G                                    |
| 7_Russia—EPI_ISL_430108 | 29870 | 32 | AAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAA    | NNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNN   |

## Italia

## Clustal Omega

| ID_SEQ                 | POS   | LENGTH | REFERENCE   | MUTATION                                 |
|------------------------|-------|--------|---|--|
| 1.Italy—EPI_ISL_412974 | 11083 | 1      | G   | T  |
| 1.Italy—EPI_ISL_412974 | 26144 | 1      | G   | T  |
| 2.Italy—EPI_ISL_412973 | 241   | 1      | C   | T  |
| 2.Italy—EPI_ISL_412973 | 3037  | 1      | C   | T  |
| 2.Italy—EPI_ISL_412973 | 14408 | 1      | C   | T  |
| 2.Italy—EPI_ISL_412973 | 23403 | 1      | A   | G  |
| 2.Italy—EPI_ISL_412973 | 29867 | 2      | TG  | NN                                       |
| 3.Italy—EPI_ISL_417423 | 0     | 1      | -   | G  |
| 3.Italy—EPI_ISL_417423 | 241   | 1      | C   | T  |
| 3.Italy—EPI_ISL_417423 | 3037  | 1      | C   | T  |
| 3.Italy—EPI_ISL_417423 | 14408 | 1      | C   | T  |
| 3.Italy—EPI_ISL_417423 | 23403 | 1      | A   | G  |
| 3.Italy—EPI_ISL_417423 | 29891 | 13     | AAAAAAAAAAAAAA                                    | -----                                    |
| 4.Italy—EPI_ISL_418256 | 42    | 1      | T   | Y  |
| 4.Italy—EPI_ISL_418256 | 44    | 2      | CG  | NN                                       |
| 4.Italy—EPI_ISL_418256 | 241   | 1      | C   | T  |
| 4.Italy—EPI_ISL_418256 | 3037  | 1      | C   | T  |
| 4.Italy—EPI_ISL_418256 | 14408 | 1      | C   | T  |
| 4.Italy—EPI_ISL_418256 | 23403 | 1      | A   | G  |
| 4.Italy—EPI_ISL_418256 | 28881 | 3      | GGG   | AAC                                      |
| 4.Italy—EPI_ISL_418256 | 29899 | 5      | AAAAA   | —  |
| 5.Italy—EPI_ISL_419254 | 1     | 25     | ATTAAGGTTATACCTTCCCAGGT                           | -----                                    |
| 5.Italy—EPI_ISL_419254 | 241   | 1      | C   | T  |
| 5.Italy—EPI_ISL_419254 | 3037  | 1      | C   | T  |
| 5.Italy—EPI_ISL_419254 | 14408 | 1      | C   | T  |
| 5.Italy—EPI_ISL_419254 | 23403 | 1      | A   | G  |
| 5.Italy—EPI_ISL_419254 | 29860 | 44     | AGGAGAATGACAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA | -----                                    |
| 6.Italy—EPI_ISL_428854 | 241   | 1      | C   | T  |
| 6.Italy—EPI_ISL_428854 | 3037  | 1      | C   | T  |
| 6.Italy—EPI_ISL_428854 | 14408 | 1      | C   | T  |
| 6.Italy—EPI_ISL_428854 | 23403 | 1      | A   | G  |
| 6.Italy—EPI_ISL_428854 | 29009 | 1      | G   | A  |
| 6.Italy—EPI_ISL_428854 | 29900 | 4      | AAAA  | —  |
| 7.Italy—EPI_ISL_435152 | 1     | 37     | ATTAAGGTTATACCTTCC<br>CAGGTAACAAACCAACC           | NNNNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNN |
| 7.Italy—EPI_ISL_435152 | 241   | 1      | C   | T  |
| 7.Italy—EPI_ISL_435152 | 3037  | 1      | C   | T  |
| 7.Italy—EPI_ISL_435152 | 5986  | 1      | C   | T  |
| 7.Italy—EPI_ISL_435152 | 6866  | 1      | A   | W  |

|                        |       |    |                                  |           |
|------------------------|-------|----|----------------------------------|-----------|
| 7_Italy—EPI_ISL_435152 | 6869  | 1  | A                                | W         |
| 7_Italy—EPI_ISL_435152 | 14408 | 1  | C                                | T         |
| 7_Italy—EPI_ISL_435152 | 23403 | 1  | A                                | G         |
| 7_Italy—EPI_ISL_435152 | 28881 | 3  | GGG                              | AAC       |
| 7_Italy—EPI_ISL_435152 | 29701 | 1  | G                                | T         |
| 7_Italy—EPI_ISL_435152 | 29879 | 25 | AAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAA | _____     |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 1     | 9  | ATTAAAGGT                        | NNNNNNNNN |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 31    | 1  | A                                | G         |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 241   | 1  | C                                | T         |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 3037  | 1  | C                                | T         |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 3045  | 1  | C                                | T         |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 6449  | 1  | C                                | T         |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 6863  | 1  | A                                | M         |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 6866  | 1  | A                                | W         |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 6869  | 1  | A                                | W         |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 14408 | 1  | C                                | T         |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 19677 | 1  | G                                | R         |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 21627 | 1  | C                                | Y         |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 23403 | 1  | A                                | G         |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 25459 | 1  | G                                | K         |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 28881 | 3  | GGG                              | AAC       |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 29874 | 30 | AAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAA | _____     |

| ID_SEQ                 | POS   | LENGTH | REFERENCE                                    | MUTATION                               |
|------------------------|-------|--------|--|--|
| 1_Italy—EPI_ISL_412974 | 11083 | 1      | G  | T                                      |
| 1_Italy—EPI_ISL_412974 | 26144 | 1      | G  | T                                      |
| 2_Italy—EPI_ISL_412973 | 241   | 1      | C  | T                                      |
| 2_Italy—EPI_ISL_412973 | 3037  | 1      | C  | T                                      |
| 2_Italy—EPI_ISL_412973 | 14408 | 1      | C  | T                                      |
| 2_Italy—EPI_ISL_412973 | 23403 | 1      | A  | G                                      |
| 2_Italy—EPI_ISL_412973 | 29867 | 2      | TG   | NN                                     |
| 3_Italy—EPI_ISL_417423 | 0     | 1      | -  | G                                      |
| 3_Italy—EPI_ISL_417423 | 241   | 1      | C  | T                                      |
| 3_Italy—EPI_ISL_417423 | 3037  | 1      | C  | T                                      |
| 3_Italy—EPI_ISL_417423 | 14408 | 1      | C  | T                                      |
| 3_Italy—EPI_ISL_417423 | 23403 | 1      | A  | G                                      |
| 3_Italy—EPI_ISL_417423 | 29879 | 13     | AAAAAAAAAAAAAA                               | —————                                  |
| 4_Italy—EPI_ISL_418256 | 42    | 1      | T  | Y                                      |
| 4_Italy—EPI_ISL_418256 | 44    | 2      | CG   | NN                                     |
| 4_Italy—EPI_ISL_418256 | 241   | 1      | C  | T                                      |
| 4_Italy—EPI_ISL_418256 | 3037  | 1      | C  | T                                      |
| 4_Italy—EPI_ISL_418256 | 14408 | 1      | C  | T                                      |
| 4_Italy—EPI_ISL_418256 | 23403 | 1      | A  | G                                      |
| 4_Italy—EPI_ISL_418256 | 28881 | 3      | GGG  | AAC                                    |
| 4_Italy—EPI_ISL_418256 | 29879 | 5      | AAAAA  | —                                      |
| 5_Italy—EPI_ISL_419254 | 1     | 25     | ATTAAGGTTTAT<br>ACCTTCCCAGGT                 | —————                                  |
| 5_Italy—EPI_ISL_419254 | 241   | 1      | C  | T                                      |
| 5_Italy—EPI_ISL_419254 | 3037  | 1      | C  | T                                      |
| 5_Italy—EPI_ISL_419254 | 14408 | 1      | C  | T                                      |
| 5_Italy—EPI_ISL_419254 | 23403 | 1      | A  | G                                      |
| 5_Italy—EPI_ISL_419254 | 29860 | 44     | AGGAGAATGACAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA | —————                                  |
| 6_Italy—EPI_ISL_428854 | 241   | 1      | C  | T                                      |
| 6_Italy—EPI_ISL_428854 | 3037  | 1      | C  | T                                      |
| 6_Italy—EPI_ISL_428854 | 14408 | 1      | C  | T                                      |
| 6_Italy—EPI_ISL_428854 | 23403 | 1      | A  | G                                      |
| 6_Italy—EPI_ISL_428854 | 29009 | 1      | G  | A                                      |
| 6_Italy—EPI_ISL_428854 | 29879 | 4      | AAAA   | —                                      |
| 7_Italy—EPI_ISL_435152 | 1     | 37     | ATTAAGGTTTACCTTC<br>CCAGGTAACAAACCAACC       | NNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNN |
| 7_Italy—EPI_ISL_435152 | 241   | 1      | C  | T                                      |
| 7_Italy—EPI_ISL_435152 | 3037  | 1      | C  | T                                      |
| 7_Italy—EPI_ISL_435152 | 5986  | 1      | C  | T                                      |
| 7_Italy—EPI_ISL_435152 | 6866  | 1      | A  | W                                      |

|                        |       |    |                                  |           |
|------------------------|-------|----|----------------------------------|-----------|
| 7_Italy—EPI_ISL_435152 | 6869  | 1  | A                                | W         |
| 7_Italy—EPI_ISL_435152 | 14408 | 1  | C                                | T         |
| 7_Italy—EPI_ISL_435152 | 23403 | 1  | A                                | G         |
| 7_Italy—EPI_ISL_435152 | 28881 | 3  | GGG                              | AAC       |
| 7_Italy—EPI_ISL_435152 | 29701 | 1  | G                                | T         |
| 7_Italy—EPI_ISL_435152 | 29879 | 25 | AAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAA   | —————     |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 1     | 9  | ATTAAAGGT                        | NNNNNNNNN |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 31    | 1  | A                                | G         |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 241   | 1  | C                                | T         |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 3037  | 1  | C                                | T         |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 3045  | 1  | C                                | T         |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 6449  | 1  | C                                | T         |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 6863  | 1  | A                                | M         |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 6866  | 1  | A                                | W         |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 6869  | 1  | A                                | W         |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 14408 | 1  | C                                | T         |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 19677 | 1  | G                                | R         |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 21627 | 1  | C                                | Y         |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 23403 | 1  | A                                | G         |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 25459 | 1  | G                                | K         |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 28881 | 3  | GGG                              | AAC       |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 29874 | 30 | AAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAA | —————     |

| ID_SEQ                 | POS   | LENGTH | REFERENCE   | MUTATION                               |
|------------------------|-------|--------|---|--|
| 1_Italy—EPI_ISL_412974 | 11083 | 1      | G   | T                                      |
| 1_Italy—EPI_ISL_412974 | 26144 | 1      | G   | T                                      |
| 2_Italy—EPI_ISL_412973 | 241   | 1      | C   | T                                      |
| 2_Italy—EPI_ISL_412973 | 3037  | 1      | C   | T                                      |
| 2_Italy—EPI_ISL_412973 | 14408 | 1      | C   | T                                      |
| 2_Italy—EPI_ISL_412973 | 23403 | 1      | A   | G                                      |
| 2_Italy—EPI_ISL_412973 | 29867 | 2      | TG  | NN                                     |
| 3_Italy—EPI_ISL_417423 | 0     | 1      | -   | G                                      |
| 3_Italy—EPI_ISL_417423 | 241   | 1      | C   | T                                      |
| 3_Italy—EPI_ISL_417423 | 3037  | 1      | C   | T                                      |
| 3_Italy—EPI_ISL_417423 | 14408 | 1      | C   | T                                      |
| 3_Italy—EPI_ISL_417423 | 23403 | 1      | A   | G                                      |
| 3_Italy—EPI_ISL_417423 | 29890 | 13     | AAAAAAAAAAAAAA                                    | —                                      |
| 4_Italy—EPI_ISL_418256 | 42    | 1      | T   | Y                                      |
| 4_Italy—EPI_ISL_418256 | 44    | 2      | CG  | NN                                     |
| 4_Italy—EPI_ISL_418256 | 241   | 1      | C   | T                                      |
| 4_Italy—EPI_ISL_418256 | 3037  | 1      | C   | T                                      |
| 4_Italy—EPI_ISL_418256 | 14408 | 1      | C   | T                                      |
| 4_Italy—EPI_ISL_418256 | 23403 | 1      | A   | G                                      |
| 4_Italy—EPI_ISL_418256 | 28881 | 3      | GGG   | AAC                                    |
| 4_Italy—EPI_ISL_418256 | 29898 | 5      | AAAAA   | —                                      |
| 5_Italy—EPI_ISL_419254 | 1     | 25     | ATTAAGGTTATA<br>CCTTCCCAGGT                       | —————                                  |
| 5_Italy—EPI_ISL_419254 | 241   | 1      | C   | T                                      |
| 5_Italy—EPI_ISL_419254 | 3037  | 1      | C   | T                                      |
| 5_Italy—EPI_ISL_419254 | 14408 | 1      | C   | T                                      |
| 5_Italy—EPI_ISL_419254 | 23403 | 1      | A   | G                                      |
| 5_Italy—EPI_ISL_419254 | 29859 | 44     | AGGAGAATGACAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA | —                                      |
| 6_Italy—EPI_ISL_428854 | 241   | 1      | C   | T                                      |
| 6_Italy—EPI_ISL_428854 | 3037  | 1      | C   | T                                      |
| 6_Italy—EPI_ISL_428854 | 14408 | 1      | C   | T                                      |
| 6_Italy—EPI_ISL_428854 | 23403 | 1      | A   | G                                      |
| 6_Italy—EPI_ISL_428854 | 29009 | 1      | G   | A                                      |
| 6_Italy—EPI_ISL_428854 | 29899 | 4      | AAAA  | —                                      |
| 7_Italy—EPI_ISL_435152 | 1     | 37     | ATTAAGGTTATACCTTCC<br>CAGGTAACAAACCAACC           | NNNNNNNNNNNNNNNN<br>NNNNNNNNNNNNNNNNNN |
| 7_Italy—EPI_ISL_435152 | 241   | 1      | C   | T                                      |
| 7_Italy—EPI_ISL_435152 | 3037  | 1      | C   | T                                      |
| 7_Italy—EPI_ISL_435152 | 5986  | 1      | C   | T                                      |
| 7_Italy—EPI_ISL_435152 | 6866  | 1      | A   | W                                      |

|                        |       |    |                                   |           |
|------------------------|-------|----|-----------------------------------|-----------|
| 7_Italy—EPI_ISL_435152 | 6869  | 1  | A                                 | W         |
| 7_Italy—EPI_ISL_435152 | 14408 | 1  | C                                 | T         |
| 7_Italy—EPI_ISL_435152 | 23403 | 1  | A                                 | G         |
| 7_Italy—EPI_ISL_435152 | 28881 | 3  | GGG                               | AAC       |
| 7_Italy—EPI_ISL_435152 | 29701 | 1  | G                                 | T         |
| 7_Italy—EPI_ISL_435152 | 29878 | 25 | AAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAA    | —————     |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 1     | 9  | ATTAAAGGT                         | NNNNNNNNN |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 31    | 1  | A                                 | G         |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 241   | 1  | C                                 | T         |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 3037  | 1  | C                                 | T         |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 3045  | 1  | C                                 | T         |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 6449  | 1  | C                                 | T         |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 6863  | 1  | A                                 | M         |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 6866  | 1  | A                                 | W         |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 6869  | 1  | A                                 | W         |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 14408 | 1  | C                                 | T         |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 19677 | 1  | G                                 | R         |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 21627 | 1  | C                                 | Y         |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 23403 | 1  | A                                 | G         |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 25459 | 1  | G                                 | K         |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 28881 | 3  | GGG                               | AAC       |
| 8_Italy—EPI_ISL_436729 | 29873 | 30 | AAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAA | —————     |

## Spagna

Clustal Omega





|                        |       |   |   |   |
|------------------------|-------|---|---|---|
| 6_Spain—EPI_ISL_444975 | 6353  | 1 | C | T |
| 6_Spain—EPI_ISL_444975 | 14407 | 1 | C | T |
| 6_Spain—EPI_ISL_444975 | 20267 | 1 | A | G |
| 6_Spain—EPI_ISL_444975 | 23402 | 1 | A | G |
| 6_Spain—EPI_ISL_444975 | 28882 | 1 | G | A |
| 6_Spain—EPI_ISL_444975 | 29687 | 1 | G | C |
| 6_Spain—EPI_ISL_444975 | 29733 | 1 | G | C |
| 7_Spain—EPI_ISL_444976 | 240   | 1 | C | T |
| 7_Spain—EPI_ISL_444976 | 3036  | 1 | C | T |
| 7_Spain—EPI_ISL_444976 | 8738  | 1 | C | T |
| 7_Spain—EPI_ISL_444976 | 14407 | 1 | C | T |
| 7_Spain—EPI_ISL_444976 | 18743 | 1 | C | T |
| 7_Spain—EPI_ISL_444976 | 20267 | 1 | A | G |
| 7_Spain—EPI_ISL_444976 | 22892 | 1 | A | G |
| 7_Spain—EPI_ISL_444976 | 23402 | 1 | A | G |

## Kalign

| ID_SEQ                 | POS   | LENGTH | REFERENCE              | MUTATION             |
|------------------------|-------|--------|------------------------|----------------------|
| 1_Spain—EPI_ISL_418251 | 240   | 1      | C                      | T                    |
| 1_Spain—EPI_ISL_418251 | 3036  | 1      | C                      | T                    |
| 1_Spain—EPI_ISL_418251 | 8781  | 1      | C                      | T                    |
| 1_Spain—EPI_ISL_418251 | 11243 | 1      | T                      | C                    |
| 1_Spain—EPI_ISL_418251 | 14407 | 1      | C                      | T                    |
| 1_Spain—EPI_ISL_418251 | 21262 | 1      | C                      | T                    |
| 1_Spain—EPI_ISL_418251 | 23402 | 1      | A                      | G                    |
| 1_Spain—EPI_ISL_418251 | 29780 | 122    | AGCTGCCTATATGGAAGAGC   | _____                |
|                        |       |        | CCTAATGTGTAAAATTAATTT  | _____                |
|                        |       |        | TAGTAGTGCTATCCCCATGTG  | _____                |
|                        |       |        | ATTTTAATAGCTTCTTAGGAG  | _____                |
|                        |       |        | AATGACAAAAAAAGAAAAAA   | _____                |
|                        |       |        | AAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAA | _____                |
| 2_Spain—EPI_ISL_419240 | 8781  | 1      | C                      | T                    |
| 2_Spain—EPI_ISL_419240 | 9476  | 1      | T                      | A                    |
| 2_Spain—EPI_ISL_419240 | 14804 | 1      | C                      | T                    |
| 2_Spain—EPI_ISL_419240 | 25978 | 1      | G                      | T                    |
| 2_Spain—EPI_ISL_419240 | 28143 | 1      | T                      | C                    |
| 2_Spain—EPI_ISL_419240 | 28656 | 1      | C                      | T                    |
| 2_Spain—EPI_ISL_419240 | 28862 | 1      | C                      | T                    |
| 2_Spain—EPI_ISL_419240 | 29786 | 116    | CTATATGGAAGAGCCCTAAT   | _____                |
|                        |       |        | GTGTAAAATTAATTTAGTAG   | _____                |
|                        |       |        | TGCTATCCCCATGTGATTAA   | _____                |
|                        |       |        | ATAGCTTCTTAGGAGAATGAC  | _____                |
|                        |       |        | AAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAA | _____                |
|                        |       |        | AAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAA | _____                |
| 3_Spain—EPI_ISL_419685 | 0     | 54     | ATTAAAGGTTATACCTTCC    | _____                |
|                        |       |        | CAGGTAACAAACCAACCAA    | _____                |
|                        |       |        | CTTCGATCTCTTGT         | _____                |
| 3_Spain—EPI_ISL_419685 | 2000  | 1      | G                      | A                    |
| 3_Spain—EPI_ISL_419685 | 5296  | 290    | ACTGCATTGTTAACACTCCA   | NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN |
|                        |       |        | ACAAATAGAGTGAAGTTA     | NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN |
|                        |       |        | ATCCACCTGCTCTACAAGATG  | NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN |
|                        |       |        | CTTATTACAGAGCAAGGGCTG  | NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN |
|                        |       |        | GTGAAGCTGCTAACTTTGTG   | NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN |
|                        |       |        | CACTTATCTTAGCCTACTGTAA | NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN |
|                        |       |        | TAAGACAGTAGGTGAGTTAGG  | NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN |
|                        |       |        | TGATGTTAGAGAAACAATGAGT | NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN |
|                        |       |        | TACTTGTTCACCATGCCAATT  | NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN |
|                        |       |        | AGATTCTGCAAAAGAGTCTTG  | NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN |
| 3_Spain—EPI_ISL_419685 | 8781  | 1      | AACGTGGTGTGAAAACCTGTG  | NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN |
|                        |       |        | GACAAACAGCAGACAACCCTAA | NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN |
| 3_Spain—EPI_ISL_419685 | 9476  | 1      | GGGTGTAGAAGCTGTATGTACA | NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN |
|                        |       |        | TGGGCACACT             | NNNNNNNNNNNNNNNNNN   |





|                        |       |   |   |   |
|------------------------|-------|---|---|---|
| 6_Spain—EPI_ISL_444976 | 20267 | 1 | A | G |
| 6_Spain—EPI_ISL_444976 | 22892 | 1 | A | G |
| 6_Spain—EPI_ISL_444976 | 23402 | 1 | A | G |
| 7_Spain—EPI_ISL_444975 | 240   | 1 | C | T |
| 7_Spain—EPI_ISL_444975 | 3036  | 1 | C | T |
| 7_Spain—EPI_ISL_444975 | 5175  | 1 | A | G |
| 7_Spain—EPI_ISL_444975 | 6353  | 1 | C | T |
| 7_Spain—EPI_ISL_444975 | 14407 | 1 | C | T |
| 7_Spain—EPI_ISL_444975 | 20267 | 1 | A | G |
| 7_Spain—EPI_ISL_444975 | 23402 | 1 | A | G |
| 7_Spain—EPI_ISL_444975 | 28882 | 1 | G | A |
| 7_Spain—EPI_ISL_444975 | 29687 | 1 | G | C |
| 7_Spain—EPI_ISL_444975 | 29733 | 1 | G | C |

MAFFT

| ID_SEQ                 | POS   | LENGTH | REFERENCE                | MUTATI       |
|------------------------|-------|--------|--------------------------|--------------|
| 1_Spain—EPI_ISL_418251 | 240   | 1      | C                        | T            |
| 1_Spain—EPI_ISL_418251 | 3036  | 1      | C                        | T            |
| 1_Spain—EPI_ISL_418251 | 8781  | 1      | C                        | T            |
| 1_Spain—EPI_ISL_418251 | 11243 | 1      | T                        | C            |
| 1_Spain—EPI_ISL_418251 | 14407 | 1      | C                        | T            |
| 1_Spain—EPI_ISL_418251 | 21262 | 1      | C                        | T            |
| 1_Spain—EPI_ISL_418251 | 23402 | 1      | A                        | G            |
| 1_Spain—EPI_ISL_418251 | 29780 | 122    | AGCTGCCTATATGGAAGAGC     |              |
|                        |       |        | CCTAATGTGTAAAATTAAATT    |              |
| 2_Spain—EPI_ISL_419240 | 8781  | 1      | TAGTAGTGCTATCCCCATGTG    |              |
|                        |       |        | ATTTTAATAGCTTCTAGGAG     |              |
| 2_Spain—EPI_ISL_419240 | 9476  | 1      | AATGACAAAAAA             |              |
|                        |       |        | AAAAAAAAAAAAAA           |              |
| 2_Spain—EPI_ISL_419240 | 14804 | 1      | A                        |              |
|                        |       |        | 2_Spain—EPI_ISL_419240   |              |
| 2_Spain—EPI_ISL_419240 | 25978 | 1      | G                        |              |
|                        |       |        | 2_Spain—EPI_ISL_419240   |              |
| 2_Spain—EPI_ISL_419240 | 28143 | 1      | T                        |              |
|                        |       |        | 2_Spain—EPI_ISL_419240   |              |
| 2_Spain—EPI_ISL_419240 | 28656 | 1      | C                        |              |
|                        |       |        | 2_Spain—EPI_ISL_419240   |              |
| 2_Spain—EPI_ISL_419240 | 28862 | 1      | T                        |              |
|                        |       |        | 2_Spain—EPI_ISL_419240   |              |
| 2_Spain—EPI_ISL_419240 | 29786 | 116    | CTATATGGAAGAGCCCTAAT     |              |
|                        |       |        | GTTGAAAATTAAATTAGTAG     |              |
| 3_Spain—EPI_ISL_419685 | 0     | 54     | TGCTATCCCCATGTGATTAA     |              |
|                        |       |        | TAGCTTCTTAGGAGAACATGACA  |              |
| 3_Spain—EPI_ISL_419685 | 2000  | 1      | AAAAAAAAAAAAAA           |              |
|                        |       |        | AAAAAAAAAAAAAA           |              |
| 3_Spain—EPI_ISL_419685 | 5296  | 290    | ATTAAAGGTTTATAACCTTCCA   |              |
|                        |       |        | GGTAACAAACCAACCAACTTT    |              |
| 3_Spain—EPI_ISL_419685 | 8781  | 1      | CGATCTCTTGT              |              |
|                        |       |        | ACTGCATTGTTAACACTCCAA    | NNNNNNNNNNNN |
| 3_Spain—EPI_ISL_419685 | 9476  | 1      | CAAATAGAGTTGAAGTTAAC     | NNNNNNNNNNNN |
|                        |       |        | CACCTGCTCTACAAGATGCTTA   | NNNNNNNNNNNN |
| 3_Spain—EPI_ISL_419685 | 11243 | 1      | TTACAGAGCAAGGGCTGGTGA    | NNNNNNNNNNNN |
|                        |       |        | GCTGCTAACCTTGTGCACTTAT   | NNNNNNNNNNNN |
| 3_Spain—EPI_ISL_419685 | 14407 | 1      | CTTAGCCTACTGTAATAAGACA   | NNNNNNNNNNNN |
|                        |       |        | GTTAGGTGAGTTAGGTGATGTTA  | NNNNNNNNNNNN |
| 3_Spain—EPI_ISL_419685 | 21262 | 1      | GAGAAACAAATGAGTTACTTGT   | NNNNNNNNNNNN |
|                        |       |        | TCAACATGCCAATTAGATTCTT   | NNNNNNNNNNNN |
| 3_Spain—EPI_ISL_419685 | 23402 | 1      | GCAAAAGAGTCTTGAACGTGGT   | NNNNNNNNNNNN |
|                        |       |        | GTGTAAAACCTGTGGACAAACAG  | NNNNNNNNNNNN |
| 3_Spain—EPI_ISL_419685 | 28143 | 1      | CAGACAACCCTTAAGGGTGTAG   | NNNNNNNNNNNN |
|                        |       |        | AAGCTGTTATGTACATGGGCACAC | NNNNNNNNNNNN |
| 3_Spain—EPI_ISL_419685 | 28656 | 1      | CT                       | NNNNNNNN     |
|                        |       |        | 3_Spain—EPI_ISL_419685   |              |
| 3_Spain—EPI_ISL_419685 | 28862 | 1      | C                        | T            |
|                        |       |        | 3_Spain—EPI_ISL_419685   |              |
| 3_Spain—EPI_ISL_419685 | 29786 | 116    | T                        | A            |
|                        |       |        | 3_Spain—EPI_ISL_419685   |              |





|                        |       |   |   |   |
|------------------------|-------|---|---|---|
| 7_Spain—EPI_ISL_444975 | 240   | 1 | C | T |
| 7_Spain—EPI_ISL_444975 | 3036  | 1 | C | T |
| 7_Spain—EPI_ISL_444975 | 5175  | 1 | A | G |
| 7_Spain—EPI_ISL_444975 | 6353  | 1 | C | T |
| 7_Spain—EPI_ISL_444975 | 14407 | 1 | C | T |
| 7_Spain—EPI_ISL_444975 | 20267 | 1 | A | G |
| 7_Spain—EPI_ISL_444975 | 23402 | 1 | A | G |
| 7_Spain—EPI_ISL_444975 | 28882 | 1 | G | A |
| 7_Spain—EPI_ISL_444975 | 29687 | 1 | G | C |
| 7_Spain—EPI_ISL_444975 | 29733 | 1 | G | C |