



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>4</b>
<b>Analisi verticale</b> . . . . .	<b>5</b>
New York (USA) . . . . .	5
Russia . . . . .	5
Italia . . . . .	5
Spagna . . . . .	5
<b>Analisi orizzontale</b> . . . . .	<b>6</b>
<b>Appendice A - risultati confronto verticale</b> . . . . .	<b>7</b>
New York (USA) . . . . .	7
Clustal Omega . . . . .	7
Kalign . . . . .	11
MAFFT . . . . .	15
Russia . . . . .	19
Clustal Omega . . . . .	19
Kalign . . . . .	21
MAFFT . . . . .	23
Italia . . . . .	25
Clustal Omega . . . . .	25
Kalign . . . . .	27
MAFFT . . . . .	29
Spagna . . . . .	31
Clustal Omega . . . . .	31
Kalign . . . . .	36
MAFFT . . . . .	42
<b>Appendice B - Risultati confronto orizzontale</b> . . . . .	<b>48</b>
Clustal Omega . . . . .	48
Kalign . . . . .	50
MAFFT . . . . .	52

## SARS-CoV-2

I coronavirus sono una famiglia di virus a RNA a filamento positivo, motivo per il quale viene indirizzato direttamente ai ribosomi per la sintesi proteica delle strutture del virus stesso e ciò rende più immediata la demolizione della cellula ospite. Hanno un aspetto simile a una corona se esaminati al microscopio elettronico (da cui il nome) e sono 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.

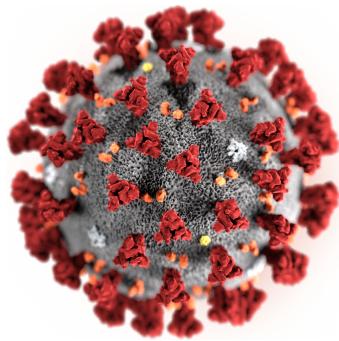


Figure 1: *L'illustrazione, creata dai Centers for Disease Control and Prevention (CDC) statunitense, rivela la morfologia ultrastrutturale del SARS-CoV-2*

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 progetto è eseguire un allineamento multiplo di sequenze utilizzando alcuni tra i vari tool di allineamento, scelti in base ai requisiti del progetto e alle sequenze utilizzate. Le variazioni individuate in output sono state appositamente documentate.

Per poter raggiungere questo obiettivo, l'analisi è stata divisa in due parti:

- Nella prima parte viene eseguita un'analisi verticale fra la sequenza di riferimento (la prima sequenza raccolta presente a database, Wuhan - Dicembre 2019) e le sequenze prese rispettivamente da Italia, New York, Spagna e Russia. Le sequenze dei singoli paesi sono state scelte seguendo un ordine temporale consecutivo, in modo tale da individuare eventuali modifiche avvenute nel tempo.
- Nella seconda parte, invece, avviene un confronto orizzontale tra le ultime sequenze raccolte dei vari paesi scelti, in modo da poter evidenziare la presenza di eventuali mutazioni nello stato corrente del virus, sempre tenendo come riferimento la prima sequenza presente nella banca dati NCI.

## Sequenze

I paesi scelti per le nostre analisi sono quelli con il più alto numero di casi di COVID-19, ossia Stati Uniti (in particolare il suo stato più colpito, 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>Italia</b>	229.858
<b>Spagna</b>	235.823

Tabella 1: Casi di COVID19 al 25 Maggio 2020

La sequenza di reference proviene dal database NCI, ed è la prima sequenza registrata nel database (Wuhan, Dicembre 2019).

PAESE	ACCESSION ID	COLLECTION DATE
Cina	NC_045512	2019-12

Tabella 2: Sequenza di reference presa dal sito NCI

Le sequenze analizzate provengono dal database GISAID. Per ogni paese sono studiate solo sequenze complete (con più di 29000 basi) provenienti da pazienti di sesso maschile, genere che è risultato più colpito, per avere dati più omogenei. Queste coprono una linea temporale che parte dalla prima sequenza presente nel database fino all'ultima, ciascuna a distanza di una settimana dall'altra.

PAESE	SEQUENZA	ACCESSION ID	COLLECTION DATE
USA	hCoV-19/USA/NY_2929/2020	EPI_ISL_420793	02/03/2020
USA	hCoV-19/USA/NY-Wadsworth-11717-01/2020	EPI_ISL_426291	08/03/2020
USA	hCoV-19/USA/NY-PV08148/2020	EPI_ISL_421365	14/03/2020
USA	hCoV-19/USA/NY-PV09019/2020	EPI_ISL_421594	21/03/2020
USA	hCoV-19/USA/NY-Wadsworth-32104-01/2020	EPI_ISL_426309	28/03/2020
USA	hCoV-19/USA/NY-NYUMC253/2020	EPI_ISL_428767	05/04/2020
USA	hCoV-19/USA/NY-NYUMC390/2020	EPI_ISL_430417	13/04/2020
USA	hCoV-19/USA/NY-NYUMC455/2020	EPI_ISL_435521	20/04/2020
USA	hCoV-19/USA/NY-NYUMC482/2020	EPI_ISL_435547	24/04/2020
Russia	hCoV-19/Russia/Moscow-62505/2020	EPI_ISL_428860	11/03/2020
Russia	hCoV-19/Russia/Moscow_PMVL-1/2020	EPI_ISL_421275	18/03/2020
Russia	hCoV-19/Russia/StPetersburg-RII4326S/2020	EPI_ISL_427337	25/03/2020
Russia	hCoV-19/Russia/Moscow-351/2020	EPI_ISL_428852	02/04/2020
Russia	hCoV-19/Russia/StPetersburg-RII4726S/2020	EPI_ISL_427334	07/04/2020
Russia	hCoV-19/Russia/StPetersburg-RII5643S/2020	EPI_ISL_430096	14/04/2020
Russia	hCoV-19/Russia/StPetersburg-RII6061S/2020	EPI_ISL_430108	15/04/2020
Italia	hCoV-19/Italy/SPL1/2020	EPI_ISL_412974	29/01/2020
Italia	hCoV-19/Italy/CDG1/2020	EPI_ISL_412973	20/02/2020
Italia	hCoV-19/Italy/FVG-ICGEB_S9/2020	EPI_ISL_417423	01/03/2020
Italia	hCoV-19/Italy/TE4880/2020	EPI_ISL_418256	14/03/2020
Italia	hCoV-19/Italy/INMI6/2020	EPI_ISL_419254	23/03/2020
Italia	hCoV-19/Italy/FVG-ICGEB_S18/2020	EPI_ISL_428854	30/03/2020
Italia	hCoV-19/Italy/TE13858/2020	EPI_ISL_435152	09/04/2020
Italia	hCoV-19/Italy/TE26643/2020	EPI_ISL_436729	27/04/2020
Spagna	hCoV-19/Spain/Madrid201105/2020	EPI_ISL_418251	25/02/2020
Spagna	hCoV-19/Spain/PaisVasco201607/2020	EPI_ISL_419240	03/03/2020
Spagna	hCoV-19/Spain/Valencia21/2020	EPI_ISL_419685	10/03/2020
Spagna	hCoV-19/Spain/Valencia206/2020	EPI_ISL_436301	17/03/2020
Spagna	hCoV-19/Spain/Valencia229/2020	EPI_ISL_436324	24/03/2020
Spagna	hCoV-19/Spain/Barcelona_VH7773/2020	EPI_ISL_444976	06/04/2020
Spagna	hCoV-19/Spain/Barcelona_VHI407/2020	EPI_ISL_444975	10/04/2020

Tabella 3: Sequenze selezionate dal sito GSAID

## Tool

Tra i tool messi a disposizione da EMBL-EBI sono stati utilizzati Clustal Omega, Kalign e MAFFT.

**Clustal Omega** 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. È stato scelto in quanto ottimale per sequenze molto lunghe e per la provata efficacia in molteplici scenari.

**Kalign** è un tool che si concentra sulle regioni locali e lavora molto velocemente, scelto in quanto particolarmente adatto per le analisi svolte sui singoli stati.

Infine **MAFFT** è stato scelto poiché attraverso l'algoritmo della trasformata di Fourier veloce ottimizza gli allineamenti in base alle proprietà fisiche, utilizzando sia un allineamento progressivo che iterativo. Anch'esso risulta ottimale per sequenze di lunghezza medio-grandi.

Per raccogliere le differenze fra le sequenze, ed eventuali differenze nei risultati ottenuti dai tre tool, è stato scritto uno script Python, sfruttando la libreria Biopython per poter gestire al meglio i file di allineamento. Il codice è consultabile presso la [repository GitLab](#).

## **Analisi verticale**

Nell'analisi verticale viene studiato singolarmente ogni paese, prendendo le sequenze scelte e confrontandole con quella di riferimento, effettuando l'allineamento con i tre tool scelti. I risultati ottenuti sono visibili nell'appendice A della relazione.

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

L'allineamento delle sequenze di New York con i tre tool produce, nonostante i diversi approcci, output identici.

In tutte le sequenze, esclusa la numero 3, sono presenti le stesse variazioni nelle posizioni 240, 3036, 1058, 14047, 23402 e 25562. La terza sequenza, infatti, è l'unica che non presenta mutazioni rilevate anche nelle altre sequenze studiate.

### **Russia**

Anche nel caso delle sequenze della Russia, come per il caso di New York, gli output ottenuti dai tre tool sono uguali.

Sono presenti delle variazioni comuni fra più sequenze rispetto al reference:

- Nelle sequenze 5 e 6 in posizione 26749
- Nelle sequenze 2, 4, 5, 6 in posizione 28880
- Nelle sequenze 1, 2, 3, 4, 6, 7 in posizione 240
- In tutte le sequenze nelle posizioni 3036, 14407, 23402

### **Italia**

L'esecuzione dei tre tool con le sequenze dell'Italia ha prodotto output con delle leggere differenze. Solo Kalign evidenzia una mutazione nella posizione 29879 delle sequenze 3, 4 e 6, mentre Clustal Omega e MAFFT mostrano dei cambiamenti nelle posizioni 29890, 29898, 29899 rispettivamente nelle sequenze 3, 4 e 6. Tutti i tool evidenziano le seguenti variazioni comuni:

- In tutte le sequenze, esclusa la 1, in posizione 241, 3037, 14408, 23403
- Nelle sequenze 4, 7, 8 in posizione 2881
- Nelle sequenze 7 e 8 nelle posizioni 6866 e 6869

### **Spagna**

L'analisi delle sequenze della Spagna denota un risultato diverso per Clustal Omega rispetto a Kalign e MAFFT, che al contrario producono risultati identici.

In particolare, con Clustal Omega sono individuate delle mutazioni nelle posizioni 5175, 6353, 28882, 29687 e 29733 della sequenza 6 e nelle posizioni 8738, 18743 e 22892 della sequenza 7. Con Kalign e MAFFT invece si hanno delle variazioni nelle posizioni 8738, 18743 e 22892 della sesta sequenza e nelle posizioni 5175, 6353, 28882, 29687 e 29733 della settima.

Tutti i tool hanno però evidenziato questi cambiamenti comuni fra più sequenze:

- Nelle sequenze 2 e 3 nelle posizioni 9476, 14804, 25978, 28143, 28656, 28862

- Nelle sequenze 1, 2 e 3 in posizione 8781
- Nelle sequenze 4, 7 e 6 in posizione 20267
- Nelle sequenze 1, 4, 5, 6, 7 nelle posizioni 240, 3036, 14407, 23402

## Analisi orizzontale

Nell'analisi orizzontale sono state selezionate le ultime sequenze considerate nelle analisi verticali dei singoli paesi, quindi le più recenti al momento della scelta, e sono state allineate sempre con la sequenza di riferimento. I risultati sono consultabili nell'appendice B della relazione.

I tre tool hanno fornito risultati identici e sono presenti delle variazioni comuni fra sequenze di paesi differenti, in particolare:

- Nella sequenza russa e in quella spagnola si ha la stessa mutazione in posizione 20267
- In tutte le sequenze si ha la stessa mutazione nelle posizioni 240, 3036, 14407 e 23402

## Appendice A - risultati confronto verticale

Di seguito sono riportate le variazioni delle sequenze selezionate divise per paese e per tool utilizzato. In ogni tabella viene indicato l'ID della sequenza, la posizione nella quale avviene una variazione, la lunghezza di tale modifica, la base (o la sequenza di basi nel caso si tratti di un cambiamento su più posizioni contigue) presente nella sequenza di riferimento e quella presente nella sequenza analizzata.

È importante tener conto che in alcune sequenze sono presenti i caratteri N, W, K, S, Y, M. *N* identifica che non è stato possibile individuare la base presente, *W (weak)* una base debole (A o T), *S (strong)* una base forte (C o G), *Y* una pimiridina (C o T), *M (amino)* una base con gruppo amminico e *K (keto)* una base con gruppo chetonico (G o T). In tutti questi casi non si è stati in grado di determinare quale fosse la precisa base presente.

Come si può notare dall'assenza della base uracile (*U*) è avvenuta la conversione da RNA a cDNA, che rappresenta DNA laboratoriale coincidente con i geni e non con il loro prodotto trascrizionale.

### 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 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 TTAGGAGAATGACAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAA	—————

3_USA—EPI_ISL_421365	0	55	ATTAAGGTTATACCTCCC AGGTAAACCAACCAACT 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	AGCTGCCTATATGGAAGAGCCC TAATGTGTAAAATTAAATTAGT AGTGCTATCCCCATGTGATTTA ATAGCTCTTAGGAGAATGACA AAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAA	
4_USA—EPI_ISL_421594	0	55	ATTAAGGTTATACCTCCAG GTAACAAACCAACCAACTTCG 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
4_USA—EPI_ISL_421594	29763	139	TGAACAAATGCTAGGGAGAGC TGCCTATATGGAAGAGCCCTA ATGTGTAAAATTAAATTAGTA GTGCTATCCCCATGTGATTTA ATAGCTCTTAGGAGAATGAC AAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAA	
5_USA—EPI_ISL_426309	0	25	ATTAAGGTTATACCTCCA 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
			TAATAGCTTCTTAGGAGAATG	
5_USA—EPI_ISL_426309	29846	56	ACAAAAAAA AAAAAAA	
6_USA—EPI_ISL_428767	0	9	ATTAAAGGT	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	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

			ATTAAGGTTATACCTCCC AGGTAACAAACCAACCAACT TTCGATCTCTTAGATCTGT TCTCTAACGAACCTTAAAT CTGTGTGGCTGTCACTCGGCT GCATGCTTAGTGCACTCACGC AGTATAATTAA	NNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNN
9_USA—EPI_ISL_435547	0	136		NNNNNNNNNNNNNNNNNN
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	CTGACACACGTTATGTGCTCATG GATGGCTCTATTATTCAATTCCCT AACACCTACCTTGAAGGTTCTGT TAGAGTGGTAACAACTTTGATT CTGAGTACT	NNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNN
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

## Kalign

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	ATTAAAGGTTATACCTTCCC AGGTAACAA	—————
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	CCATGTGATTTAATAGCTT CTTAGGAGAACAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAA AAAAAA	—————
3_USA—EPI_ISL_421365	0	55	ATTAAAGGTTATACCTTCC CAGGTAACAAACCAACCAAC TTTCGATCTCTT 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

				AGCTGCCTATATGGAAGAGCC	
3_USA—EPI.ISL.421365	29780	122		CTAATGTGAAAATTAAATTAA	
				GTAGTGCTATCCCCATGTGATT	
				TTAATAGCTTCTTAGGAGAATG	
				ACAAAAAAA AAAAAAA	
				AAAAAAA	
4_USA—EPI.ISL.421594	0	55		ATTAAAGGTTATACCTTCCA	
				GGTAACAAACCAACCAACTTT	
				CGATCTCTTGTA	
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	
				CCTATATGGAAGAGCCCTAATGT	
4_USA—EPI.ISL.421594	29763	139		GTAAAATTAAATTAGTAGTGCTA	
				TCCCCATGTGATTAAATAGCTTC	
				TTAGGAGAATGACAAAAAAA AAAAAAA	
				AAAAAAA	
5_USA—EPI.ISL.426309	0	25		ATTAAAGGTTATACCTCCAGGT	
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
				TAATAGCTTCTTAGGAGAATGA	
5_USA—EPI.ISL.426309	29846	56		CAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAA	
6_USA—EPI.ISL.428767	0	9		ATTAAAGGT	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



9_USA—EPI_ISL_435547	9113	102	CTGACACACGTTATGTGCTC ATGGATGGCTCTATTATTCAA TTTCCTAACACCTACCTTGAA GGTTCTGTTAGAGTGGTAACA ACTTTGATTCTGAGTACT	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN 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	ATTAAAGGTTTACCTTCCCAG 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 TTAGGAGAATGACA AAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAA	
3_USA—EPI.ISL_421365	0	55	ATTAAAGGTTTACCTTCCC AGGTAACAAACCAACCAACTT TCGATCTCTTGTA	
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

			AGCTGCCTATATGGAAGAGCC	
3_USA—EPI.ISL_421365	29780	122	CTAATGTGAAAATTAAATTTA	
			GTAATGCTATCCCCATGTGATT	
			TTAATAGCTTCTTAGGAGAACATG	
			ACAAAAA AAAAA	
			AAAAA	
4_USA—EPI.ISL_421594	0	55	ATTAAAGGTTATACCTTCCCA	
			GGTAACAAACCAACCAACTTT	
			CGATCTCTTGTA	
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	
			TGCCTATATGGAAGAGCCCTA	
4_USA—EPI.ISL_421594	29763	139	ATGTGAAAATTAAATTTAGTA	
			GTGCTATCCCCATGTGATTAA	
			ATAGCTTCTTAGGAGAACATGAC	
			AAAAA AAAAA	
			AAAAA	
5_USA—EPI.ISL_426309	0	25	ATTAAAGGTTATACCTTCCCA	
			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
			TAATAGCTTCTTAGGAGAACATG	
5_USA—EPI.ISL_426309	29846	56	ACAAAAA AAAAA	
			AAAAA	
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	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
9_USA—EPI_ISL_435547			ATTAAGGTTTACCTTCCC AGGTAAACCAACCAAC TTTCGATCTCTGTAGATCTG TTCTCTAACGAACCTTAAAA TCTGTGTGGCTGTCACTCGGC TGCGATGCTTAGTGCACTCACG CAGTATAATTAA	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN 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

9_USA—EPI.ISL_435547	9113	102	CTGACACACGTTATGTGCTCA TGGATGGCTCTATTATTCAATT TCCTAACACACTACCTTGAAGG TTCTGTTAGAGTGGTAACAAC TTTGATTCTGAGTACT	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN 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

## 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	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



## Kalign

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

				TTTAAAATCTGTGTGGCTGT CACTCGGCTGCATGCTTAGT GCACTCACGCAGTATAATT ATAACTAATTACTGTCGTTG ACAGGACACGAGTAACTCG TCTATCTTCTGCAGGCTGCT TACGGTTTCGTCGTGTTGC AGCCGATCATCAGCACATCT AGGTTTCGTCGGGTGTGACC	NNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNN
5_Russia—EPI_ISL_427334	75	180		C	T
5_Russia—EPI_ISL_427334	3036	1		C	T
5_Russia—EPI_ISL_427334	14407	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 AAAAA	NNNNNNNNNNNNNNNN 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		AAAAA AAAAA	NNNNNNNNNNNNNNNN 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		AAAAA AAAAA	NNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNN

## MAFFT

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

				TTTAAAATCTGTGTGGCTGTC ACTCGGCTGCATGCTTAGTGC ACTCACGCAGTATAATTAAATAA CTAATTACTGTCGTTGACAGGA CACGAGTAACTCGTCTATCTTC TGCAGGCTGCTTACGGTTCGT CCGTGTTGCAGCCGATCATCAG CACATCTAGGTTCGTCCGGGT GTGACC	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
5_Russia—EPI_ISL_427334	75	180		C	T
5_Russia—EPI_ISL_427334	3036	1		C	T
5_Russia—EPI_ISL_427334	14407	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 AAAAA	NNNNNNNNNNNNNNNNNN 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		AAAAA AAAAA	NNNNNNNNNNNNNNNNNN 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		AAAAA AAAAA	NNNNNNNNNNNNNNNNNN 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	ATTAAAGGTTATACCTTCCCAGGT	—————
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	AGGAGAATGACA AAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAA	—————
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 CAGGTAACAAACCAACC	NNNNNNNNNNNNNNNNNN 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	AAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAA	————— —————
8_Italy—EPI_ISL_436729	1	9	ATTAAGGT	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	AAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAA	————— —————

## Kalign

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	ATTAAAGGTTTAT 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	AGGAGAATGACAAAAAAAAAA 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	29879	4	AAAA	—
7_Italy—EPI_ISL_435152	1	37	ATTAAGGTTATACCTTC CCAGGTAACAAACCAACC	NNNNNNNNNNNNNNNN 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 AAAAAAAAAAAAAA	—————
8_Italy—EPI_ISL_436729	1	9	ATTAAGGT	NNNNNNNN
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	AAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAA	—————

## MAFFT

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 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 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	29899	4	AAAA	—
7_Italy—EPI_ISL_435152	1	37	ATTAAGGTTTACCTCC CAGGTAACAAACCAACC	NNNNNNNNNNNNNNNN 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 AAAAAAAAAAAAAA	—————
8_Italy—EPI_ISL_436729	1	9	ATTAAAGGT	NNNNNNNNNN
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 AAAAAAAAAAAAAA	—————

## Spagna

Clustal Omega

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	
			CCTAATGTGAAAATTAAATT	
1_Spain—EPI_ISL_418251	29780	122	TTAGTAGTGCTATCCCCATG	
			TGATTTTAATAGCTTCTTAG	
1_Spain—EPI_ISL_418251	29780	122	GAGAATGACAAAAAAAAAAAAA	
			AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	
2_Spain—EPI_ISL_419240	8781	1	AA	
			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	CTATATGGAAGAGCCCTAATG	
			TGTAAAATTAATTAGTAGTG	
2_Spain—EPI_ISL_419240	29786	116	CTATCCCCATGTGATTAAATA	
			GCTTCTTAGGAGAATGACAA	
2_Spain—EPI_ISL_419240	29786	116	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	
			AAAAAAAAAAAAAA	
3_Spain—EPI_ISL_419685	0	54	ATTAAAGGTTTATACCTCCC	
			AGGTAACAAACCAACCAACT	
3_Spain—EPI_ISL_419685	2000	1	TTCGATCTCTTGT	
			G	A





4_Spain—EPI_ISL_436301	20267	1	A	G
4_Spain—EPI_ISL_436301	23402	1	A	G
4_Spain—EPI_ISL_436301	27577	1	A	W
4_Spain—EPI_ISL_436301	28811	1	G	K
			AGCTTCTTAGGAGAATGACA	
4_Spain—EPI_ISL_436301	29850	52	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	
			AAAAAAAAAAAAAAA	
			ATTAAAGGTTTATACCTTCC	
5_Spain—EPI_ISL_436324	0	47	CAGGTAACAAACCAACCAA	
			CTTCGAT	
5_Spain—EPI_ISL_436324	240	1	C	T
5_Spain—EPI_ISL_436324	3036	1	C	T
			TCTGCGGTATGTGGAAAGGT	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
			TATGGCTGTAGTTGTGATCA	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
			ACTCCGCGAACCCATGCTTC	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
			AGTCAGCTGATGCACAATCG	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
			TTTTAAACGGGTTGCGGT	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
			GTAAGTGCAGCCGTCTTAC	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
5_Spain—EPI_ISL_436324	13379	227	ACCGTGCGGCACAGGCACTA	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
			GTACTGATGTCGTATACAGG	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
			GCTTTGACATCTACAATGA	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
			TAAAGTAGCTGGTTTGCTA	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
			AATTCCCTAAAAACTAATTGT	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
			TGTCGCT	NNNNNNN
5_Spain—EPI_ISL_436324	14407	1	C	T
5_Spain—EPI_ISL_436324	22403	1	A	W
5_Spain—EPI_ISL_436324	23402	1	A	G
5_Spain—EPI_ISL_436324	29143	1	C	T
			AGCTTCTTAGGAGAATGACA	
5_Spain—EPI_ISL_436324	29850	52	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	
			AAAAAAAAAAAAAAA	
6_Spain—EPI_ISL_444975	240	1	C	T
6_Spain—EPI_ISL_444975	3036	1	C	T
6_Spain—EPI_ISL_444975	5175	1	A	G
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	PO	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	AGCTGCCTATATGGAA GAGCCCTAATGTGTA AAATTAATTAGTGA GTGCTATCCCCATGT GATTTTAATAGCTTC TTAGGAGAACATGACAA AAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAA
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	CTATATGGAAGAGCC CTAATGTGTAAATT AATTTTAGTAGTGCT ATCCCCATGTGATT TAATAGCTTCTTAGG AGAATGACAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA
3_Spain—EPI_ISL_419685	0	54	ATTAAAGGTTATACC TTCCCAGGTAACAAAC CAACCAAATTTCGATC TCTTGT	
3_Spain—EPI_ISL_419685	2000	1	G	A





				CCATGTGATTTAATA	
3_Spain—EPI_ISL_419685	29835	67		GCTTCTTAGGAGAAC	
				ACAAAAAAA	
				AAAAAAA	
				AAAAA	
4_Spain—EPI_ISL_436301	0	49		ATTAAAGGTTTACCT	
				TCCCAGGTAACAAACC	
				AACCAACTTCGATCT	
4_Spain—EPI_ISL_436301	240	1		C	T
4_Spain—EPI_ISL_436301	3036	1		C	T
4_Spain—EPI_ISL_436301	8655	150		TAAACATACTGACTT	NNNNNNNNNNNNNN
				TTCAAGTGAAATCAT	NNNNNNNNNNNNNNN
				AGGATACAAGGCTAT	NNNNNNNNNNNNNNN
				TGATGGTGGTGTAC	NNNNNNNNNNNNNNN
				TCGTGACATAGCATT	NNNNNNNNNNNNNNN
				TACAGATACTTGT	NNNNNNNNNNNNNNN
				TGCTAACAAACATGC	NNNNNNNNNNNNNNN
				TGATTTGACACATG	NNNNNNNNNNNNNNN
				GTTTAGCCAGCGTGG	NNNNNNNNNNNNNNN
				TGGTAGTTATACTAA	NNNNNNNNNNNNNNN
4_Spain—EPI_ISL_436301	8807	74		ACAAAGCTTGCCCA	NNNNNNNNNNNNNN
				TTGATTGCTGCAGTC	NNNNNNNNNNNNNN
				ATAACAAGAGAACGTG	NNNNNNNNNNNNNN
				GGTTTTGTCGTGCCCTG	NNNNNNNNNNNNNN
				GTTTGCCCTGGCACG	NNNNNNNNNNNNNN
4_Spain—EPI_ISL_436301	8888	5		GCACA	NNNN
4_Spain—EPI_ISL_436301	14407	1		C	T
4_Spain—EPI_ISL_436301	17125	1		T	C
4_Spain—EPI_ISL_436301	20267	1		A	G
4_Spain—EPI_ISL_436301	23402	1		A	G
4_Spain—EPI_ISL_436301	27577	1		A	W
4_Spain—EPI_ISL_436301	28811	1		G	K
4_Spain—EPI_ISL_436301	29850	52		AGCTTCTTAGGAGAA	
				TGACAAAAAAA	
				AAAAAAA	
				AAAAAA	
5_Spain—EPI_ISL_436324	0	47		ATTAAAGGTTTACCT	
				TTCCCAGGTAACAAAC	
				CAACCAACTTCGAT	
5_Spain—EPI_ISL_436324	240	1		C	T
5_Spain—EPI_ISL_436324	3036	1		C	T



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	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			AGCTGCCTATATGGA AGAGCCCTAATGTGT AAAATTAAATTAGT AGTGCTATCCCCATG TGATTTAATAGCTT CTTAGGAGAATGACA AAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAA AA	_____
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			CTATATGGAAGAGGCC CTAATGTGTAAAATT AATTTAGTAGTGCT ATCCCCATGTGATT TAATAGCTCTTAGG AGAATGACAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAA	_____
3_Spain—EPI_ISL_419685	0	54	ATTAAGGTTATACCT TCCCAGGTAACAAACCA ACCAACTTCGATCTCTGT	_____
3_Spain—EPI_ISL_419685	2000	1	G	A





				CCATGTGATTAAAT	
3_Spain—EPI_ISL_419685	29835	67		AGCTTCTTAGGAGA	
				ATGACAAAAAAA	
				AAAAAAAAAAAAAA	
				AAAAAAAAAA	
4_Spain—EPI_ISL_436301	0	49		ATTAAGGTTTATAC	
				CTTCCCAGGTAACAA	
				ACCAACCAACTTCG	
				ATCT	
4_Spain—EPI_ISL_436301	240	1		C	T
4_Spain—EPI_ISL_436301	3036	1		C	T
				TAAACATACTGACTTT	NNNNNNNNNNNNNNNN
				TCAAGTGAAATCATA	NNNNNNNNNNNNNNNN
				GGATACAAGGCTATT	NNNNNNNNNNNNNNNN
				GATGGTGGTGTCACT	NNNNNNNNNNNNNNNN
4_Spain—EPI_ISL_436301	8655	150		CGTGACATAGCATCT	NNNNNNNNNNNNNNNN
				ACAGATACTTGTTTT	NNNNNNNNNNNNNNNN
				GCTAACAAACATGCT	NNNNNNNNNNNNNNNN
				GATTTGACACATGG	NNNNNNNNNNNNNNNN
				TTTAGCCAGCGTGGT	NNNNNNNNNNNNNNNN
				GGTAGTTATACTAA	NNNNNNNNNNNNNNNN
4_Spain—EPI_ISL_436301	8807	74		ACAAAGCTGCCCAT	NNNNNNNNNNNNNNNN
				TGATTGCTGCAGTC	NNNNNNNNNNNNNNNN
				TAACAAAGAGAACGTGG	NNNNNNNNNNNNNNNN
				GTTTGTCTGCCTG	NNNNNNNNNNNNNNNN
				GTTCGCCTGGCACG	NNNNNNNNNNNNNNNN
4_Spain—EPI_ISL_436301	8888	5		GCACA	NNNN
4_Spain—EPI_ISL_436301	14407	1		C	T
4_Spain—EPI_ISL_436301	17125	1		T	C
4_Spain—EPI_ISL_436301	20267	1		A	G
4_Spain—EPI_ISL_436301	23402	1		A	G
4_Spain—EPI_ISL_436301	27577	1		A	W
4_Spain—EPI_ISL_436301	28811	1		G	K
				AGCTTCTTAGGAGAA	
4_Spain—EPI_ISL_436301	29850	52		TGACAAAAAAA	
				AAAAAAAAAAAAAA	
				AAAAAAAAAAAAAA	
				AAAAAAA	
5_Spain—EPI_ISL_436324	0	47		ATTAAGGTTTATAC	
				CTTCCCAGGTAACAA	
				ACCAACCAACTTCG	
				AT	

5_Spain—EPI_ISL_436324	240	1	C	T
5_Spain—EPI_ISL_436324	3036	1	C	T
			TCTGCGGTATGTGGAA AGTTATGGCTGTAG TTGTGATCAACTCCG CGAACCCATGCTTCA GTCAGCTGATGCACA ATCGTTTTAACGG GTTTGCGGTGTAAAGT GCAGCCCGTCTTACA CCGTGCGGCACAGGC ACTAGTACTGATGTC GTATAACAGGGCTTT GACATCTACAATGAT AAAGTAGCTGGTTT GCTAAATTCCCTAAAA ACTAATTGTTGTCGCT	NNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNN
5_Spain—EPI_ISL_436324	13379	227		
5_Spain—EPI_ISL_436324	14407	1	C	T
5_Spain—EPI_ISL_436324	22403	1	A	W
5_Spain—EPI_ISL_436324	23402	1	A	G
5_Spain—EPI_ISL_436324	29143	1	C	T
5_Spain—EPI_ISL_436324	29850	52	AGCTTCTTAGGAGAA TGACAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAA	————— —————
6_Spain—EPI_ISL_444976	240	1	C	T
6_Spain—EPI_ISL_444976	3036	1	C	T
6_Spain—EPI_ISL_444976	8738	1	C	T
6_Spain—EPI_ISL_444976	14407	1	C	T
6_Spain—EPI_ISL_444976	18743	1	C	T
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

## Appendice B - Risultati confronto orizzontale

Di seguito sono riportati le variazioni delle sequenze selezionate, l'ultima individuata per ogni paese analizzato nel confronto verticale, suddivise per il tool utilizzato. In ogni tabella viene indicato l'ID della sequenza, la posizione nella quale avviene una variazione, la lunghezza di tale modifica, la base (o la sequenza di basi nel caso si tratti di un cambiamento su più posizioni contigue) presente nella sequenza di riferimento e quella presente nella sequenza analizzata.

Come specificato per i risultati del confronto verticale, anche in questo caso in alcune sequenze sono presenti i caratteri N, W, K, S, Y, M.

### Clustal Omega

ID_SEQ	POS	LENGTH	REFERENCE	MUTATION
Italy—EPI_ISL_436729	0	9	ATTAAAGGT	NNNNNNNNN
Italy—EPI_ISL_436729	30	1	A	G
Italy—EPI_ISL_436729	240	1	C	T
Italy—EPI_ISL_436729	3036	1	C	T
Italy—EPI_ISL_436729	3044	1	C	T
Italy—EPI_ISL_436729	6448	1	C	T
Italy—EPI_ISL_436729	6862	1	A	M
Italy—EPI_ISL_436729	6865	1	A	W
Italy—EPI_ISL_436729	6868	1	A	W
Italy—EPI_ISL_436729	14407	1	C	T
Italy—EPI_ISL_436729	19676	1	G	R
Italy—EPI_ISL_436729	21626	1	C	Y
Italy—EPI_ISL_436729	23402	1	A	G
Italy—EPI_ISL_436729	25458	1	G	K
Italy—EPI_ISL_436729	28880	3	GGG	AAC
Italy—EPI_ISL_436729	29872	30	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA	—————
Russia—EPI_ISL_430108	240	1	C	T
Russia—EPI_ISL_430108	834	1	C	T
Russia—EPI_ISL_430108	3036	1	C	T
Russia—EPI_ISL_430108	14407	1	C	T
Russia—EPI_ISL_430108	20267	1	A	G
Russia—EPI_ISL_430108	23402	1	A	G
Russia—EPI_ISL_430108	29870	32	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA	NNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNN

Spain—EPI_ISL_444975	240	1	C	T
Spain—EPI_ISL_444975	3036	1	C	T
Spain—EPI_ISL_444975	5175	1	A	G
Spain—EPI_ISL_444975	6353	1	C	T
Spain—EPI_ISL_444975	14407	1	C	T
Spain—EPI_ISL_444975	20267	1	A	G
Spain—EPI_ISL_444975	23402	1	A	G
Spain—EPI_ISL_444975	28882	1	G	A
Spain—EPI_ISL_444975	29687	1	G	C
Spain—EPI_ISL_444975	29733	1	G	C
USA—EPI_ISL_435547			ATTAAAGGTTTATACCTTCC CAGGTAAACAAACCAACCAA CTTCGATCTCTTAGATCT GTTCTCTAACGAACCTTAAA ATCTGTGTGGCTGTCACTCGG CTGCATGCTTAGTGCACTCAC GCAGTATAATTAA	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
USA—EPI_ISL_435547	145	3	ACT	NNN
USA—EPI_ISL_435547	240	1	C	T
USA—EPI_ISL_435547	1058	1	C	T
USA—EPI_ISL_435547	3036	1	C	T
USA—EPI_ISL_435547			CTGACACACGTTATGTGCTC ATGGATGGCTCTATTATTCAA TTTCCTAACACCTACCTTGAA GGTTCTGTTAGAGTGGTAACA ACTTTGATTCTGAGTACT	NNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNN NN
USA—EPI_ISL_435547	11915	1	C	T
USA—EPI_ISL_435547	14407	1	C	T
USA—EPI_ISL_435547	18997	1	C	T
USA—EPI_ISL_435547	23402	1	A	G
USA—EPI_ISL_435547	25562	1	G	T
USA—EPI_ISL_435547	27058	1	C	T
USA—EPI_ISL_435547	29539	1	G	A
USA—EPI_ISL_435547	29901	1	A	N

## Kalign

ID_SEQ	POS	LENGTH	REFERENCE	MUTATION
Italy—EPI_ISL_436729	0	9	ATTAAAGGT	NNNNNNNNN
Italy—EPI_ISL_436729	30	1	A	G
Italy—EPI_ISL_436729	240	1	C	T
Italy—EPI_ISL_436729	3036	1	C	T
Italy—EPI_ISL_436729	3044	1	C	T
Italy—EPI_ISL_436729	6448	1	C	T
Italy—EPI_ISL_436729	6862	1	A	M
Italy—EPI_ISL_436729	6865	1	A	W
Italy—EPI_ISL_436729	6868	1	A	W
Italy—EPI_ISL_436729	14407	1	C	T
Italy—EPI_ISL_436729	19676	1	G	R
Italy—EPI_ISL_436729	21626	1	C	Y
Italy—EPI_ISL_436729	23402	1	A	G
Italy—EPI_ISL_436729	25458	1	G	K
Italy—EPI_ISL_436729	28880	3	GGG	AAC
Italy—EPI_ISL_436729	29872	30	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA	—————
Russia—EPI_ISL_430108	240	1	C	T
Russia—EPI_ISL_430108	834	1	C	T
Russia—EPI_ISL_430108	3036	1	C	T
Russia—EPI_ISL_430108	14407	1	C	T
Russia—EPI_ISL_430108	20267	1	A	G
Russia—EPI_ISL_430108	23402	1	A	G
Russia—EPI_ISL_430108	29870	32	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA	NNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNN
Spain—EPI_ISL_444975	240	1	C	T
Spain—EPI_ISL_444975	3036	1	C	T
Spain—EPI_ISL_444975	5175	1	A	G
Spain—EPI_ISL_444975	6353	1	C	T
Spain—EPI_ISL_444975	14407	1	C	T
Spain—EPI_ISL_444975	20267	1	A	G
Spain—EPI_ISL_444975	23402	1	A	G



## MAFFT

ID_SEQ	POS	LENGTH	REFERENCE	MUTATION
Italy—EPI_ISL_436729	0	9	ATTAAGGT	NNNNNNNNN
Italy—EPI_ISL_436729	30	1	A	G
Italy—EPI_ISL_436729	240	1	C	T
Italy—EPI_ISL_436729	3036	1	C	T
Italy—EPI_ISL_436729	3044	1	C	T
Italy—EPI_ISL_436729	6448	1	C	T
Italy—EPI_ISL_436729	6862	1	A	M
Italy—EPI_ISL_436729	6865	1	A	W
Italy—EPI_ISL_436729	6868	1	A	W
Italy—EPI_ISL_436729	14407	1	C	T
Italy—EPI_ISL_436729	19676	1	G	R
Italy—EPI_ISL_436729	21626	1	C	Y
Italy—EPI_ISL_436729	23402	1	A	G
Italy—EPI_ISL_436729	25458	1	G	K
Italy—EPI_ISL_436729	28880	3	GGG	AAC
Italy—EPI_ISL_436729	29872	30	AAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAA	————— —————
Russia—EPI_ISL_430108	240	1	C	T
Russia—EPI_ISL_430108	834	1	C	T
Russia—EPI_ISL_430108	3036	1	C	T
Russia—EPI_ISL_430108	14407	1	C	T
Russia—EPI_ISL_430108	20267	1	A	G
Russia—EPI_ISL_430108	23402	1	A	G
Russia—EPI_ISL_430108	29870	32	AAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAA	NNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNN
Spain—EPI_ISL_444975	240	1	C	T
Spain—EPI_ISL_444975	3036	1	C	T
Spain—EPI_ISL_444975	5175	1	A	G
Spain—EPI_ISL_444975	6353	1	C	T
Spain—EPI_ISL_444975	14407	1	C	T
Spain—EPI_ISL_444975	20267	1	A	G
Spain—EPI_ISL_444975	23402	1	A	G

Spain—EPI_ISL_444975	28882	1	G	A
Spain—EPI_ISL_444975	29687	1	G	C
Spain—EPI_ISL_444975	29733	1	G	C
USA—EPI_ISL_435547	0	136	ATTAAAGGTTTATAC CTTCCCAGGTAACAA ACCAACCAACTTCG ATCTCTGTAGATCTG TTCTCTAACGAACCT TAAAATCTGTGTGGCT GTCACTCGGCTGCATG CTTAGTGCACTCACGC AGTATAATTAA	NNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNN
USA—EPI_ISL_435547	145	3	ACT	NNN
USA—EPI_ISL_435547	240	1	C	T
USA—EPI_ISL_435547	1058	1	C	T
USA—EPI_ISL_435547	3036	1	C	T
USA—EPI_ISL_435547	9113	102	CTGACACACGTTATG TGCTCATGGATGGCT CTATTATTCAATTCC TAACACCTACCTTGA AGGTTCTGTTAGAGT GGTAACAACCTTTGA TTCTGAGTACT	NNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNN
USA—EPI_ISL_435547	11915	1	C	T
USA—EPI_ISL_435547	14407	1	C	T
USA—EPI_ISL_435547	18997	1	C	T
USA—EPI_ISL_435547	23402	1	A	G
USA—EPI_ISL_435547	25562	1	G	T
USA—EPI_ISL_435547	27058	1	C	T
USA—EPI_ISL_435547	29539	1	G	A
USA—EPI_ISL_435547	29901	1	A	N