I-Co-Gen

Istruzioni per il caricamento dei dati e per l'invio a GISAID



Modalità di inserimento dei dati

• A mano: interfaccia web IRIDA-ARIES



• Batch: ftps



Interfaccia web IRIDA-ARIES

https://irida.iss.it/irida21-aries

Istituto Superiore di Sanità

RIDARIES

Benvenuti nella Piattaforma IRIDA-ARIES

IRIDA (Integrated Rapid Infectious Disease Analysis) ARIES (Advanced Research Infrastructure for Experimentation in GenomicS) è una infrastruttura disegnata per la raccolta, analisi automatica dei dati e scambio di informazioni derivanti dalla caratterizzazione genomica degli agenti infettivi. È stata sviluppata per fornire agli operatori di sanità pubblica gli strumenti necessari per utilizzare i dati di caratterizzazione genomica dei microrganismi in supporto alla sorveglianza delle malattie infettive. IRIDA è un software open-source sviluppato da un consorzio di base in Canada (irida.ca).

ARIES è un'istanza Galaxy sviluppata dal Laboratorio Europeo di Riferimento per *E. coli* installata sui servers dell'Istituto Superiore di Sanità che fornisce uno spettro completo di strumenti per l'analisi dei dati ad alta intensità dedicata alla microbiologia di sanità pubblica (https://w3.iss.it/site/aries/).

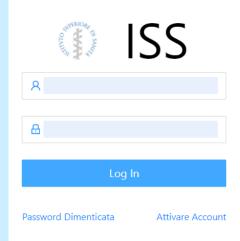
La piattaforma IRIDA-ARIES è stata concepita ed adattata alle necessità della sorveglianza genomica nazionale italiana dal Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria dell'Istituto Superiore di Sanità.

Stefano Morabito (project coordinator), Arnold Knijn (developer and administrator).

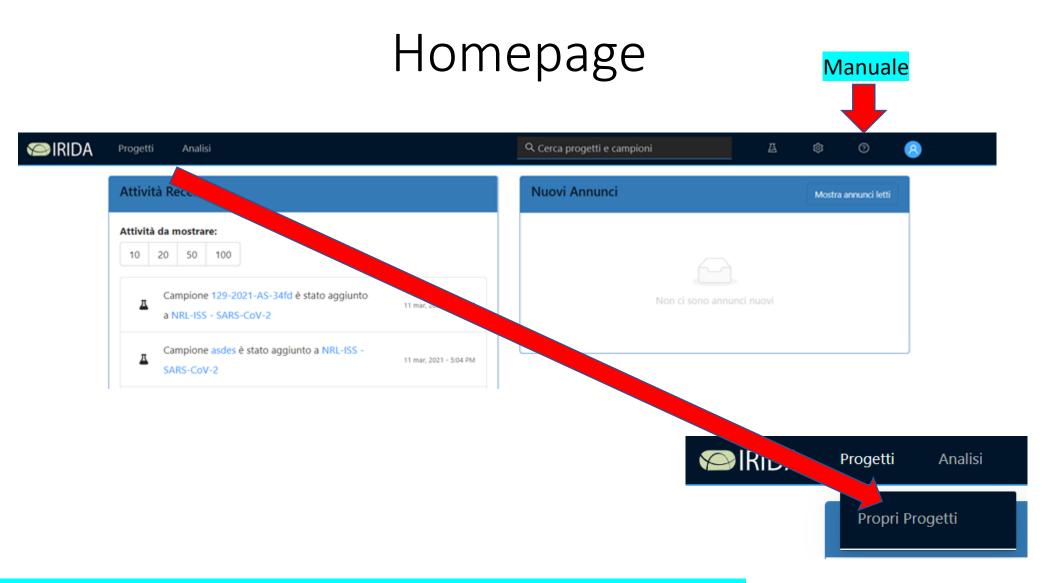






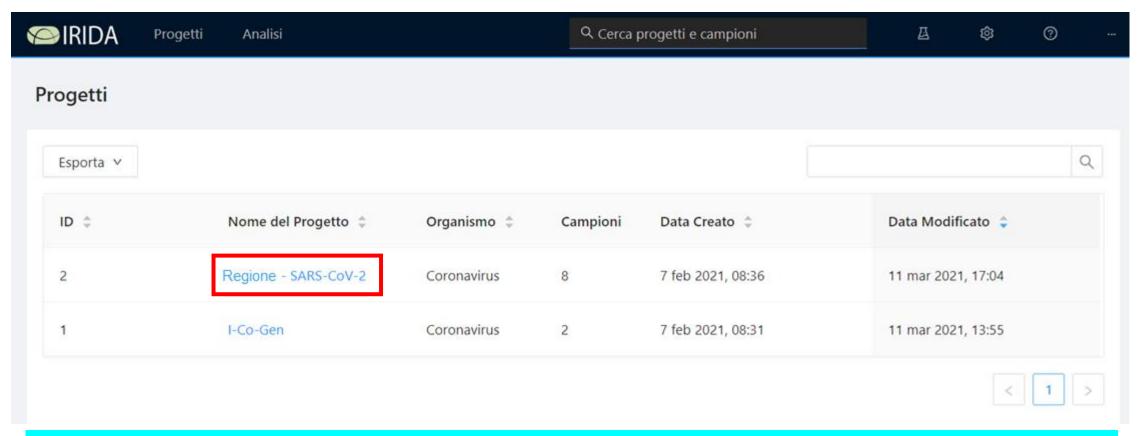


Il browser Safari ha dimostrato incompatibilità con le date, si consiglia di utilizzare Firefox, Chrome, Edge o Opera.



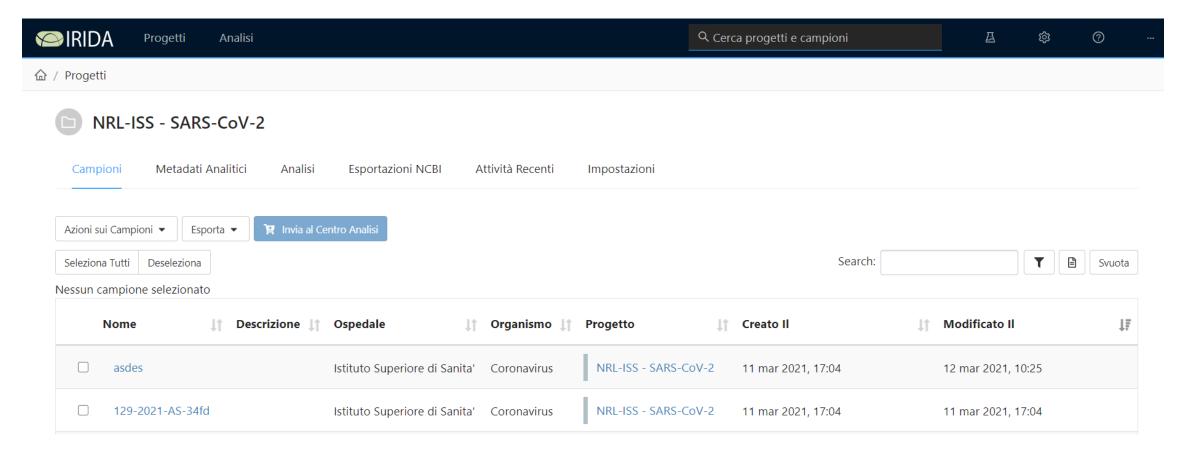
Nella pagina iniziale, dal menù Progetti, si seleziona la voce «Propri Progetti».

Progetti



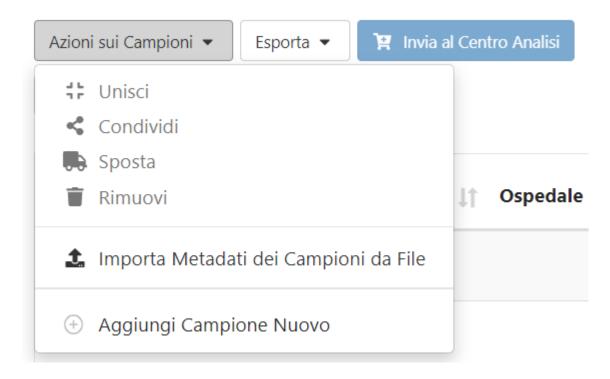
Nella pagina Progetti ci sono due progetti «Sorveglianza Genomica SARS-CoV-2» che raccoglie i dati Nazionali e «[Nome della Regione] – SARS-CoV-2» con i dati Regionali. Si entra nel Progetto Regionale, cliccando sul nome dello stesso.

Progetto Regionale



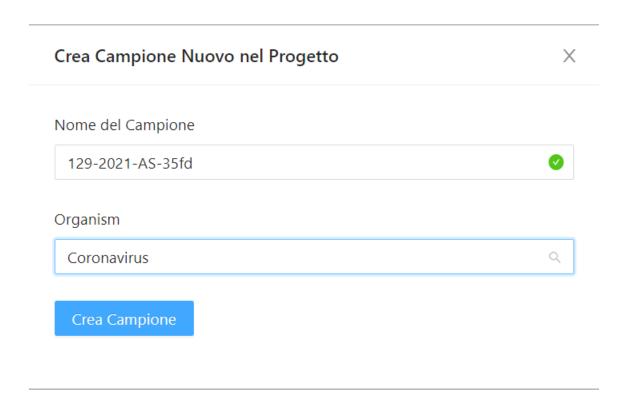
Nella pagina del Progetto Regionale sono elencati i campioni finora caricati. Inoltre esistono varie schede che contengono ulteriori informazioni sul Progetto.

Aggiungi Campione Nuovo



Per aggiungere un campione nuovo, si seleziona la voce «Aggiungi Campione Nuovo» dal menù «Azioni sui Campioni» nella scheda «Campioni» della pagina del Progetto Regionale.

Inserimento Campione Nuovo



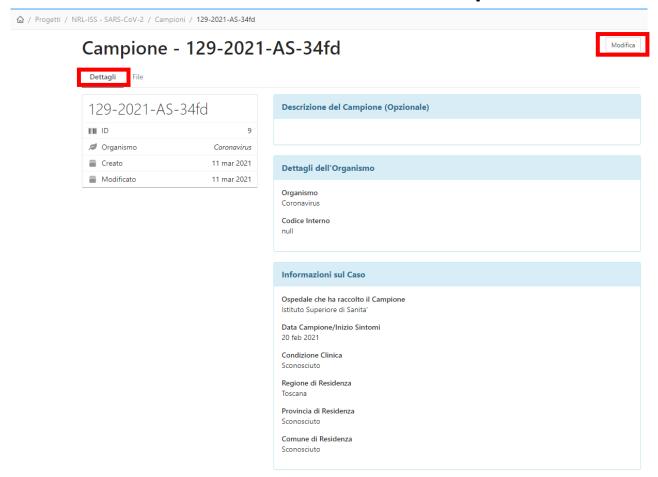
Occorre inserire il Nome del Campione e selezionare «Coronavirus» dal menù a tendina per l'Organismo e premere sul pulsante «Crea Campione».

Campione Nuovo



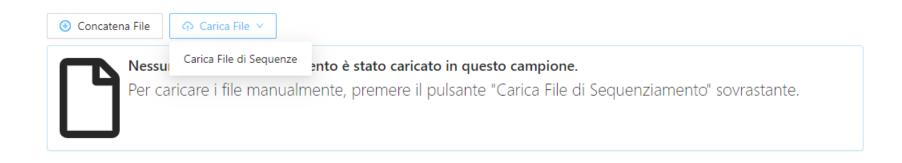
Alla creazione del nuovo campione, si aprirà la pagina dello stesso.

Metadati del Campione



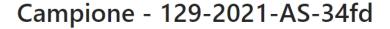
Selezionando la scheda «Dettagli», si possono inserire dei dati a corredo dal campione premendo il pulsante «Modifica». Non è obbligatorio, si consiglia di inserire la data del campione.

Caricamento Sequenza



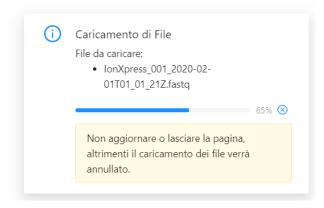
Premendo il pulsante «Carica File di Sequenze», si aprirà una finestra modale per selezionare il file di sequenziamento (nel caso di dati paired-end, i due file contemporaneamente) da caricare.

Caricamento Sequenza



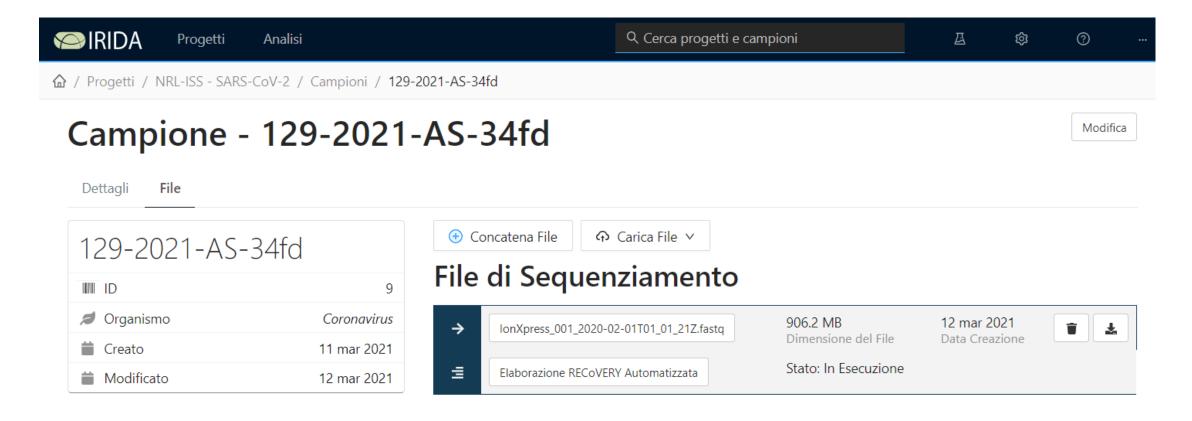
Modifica





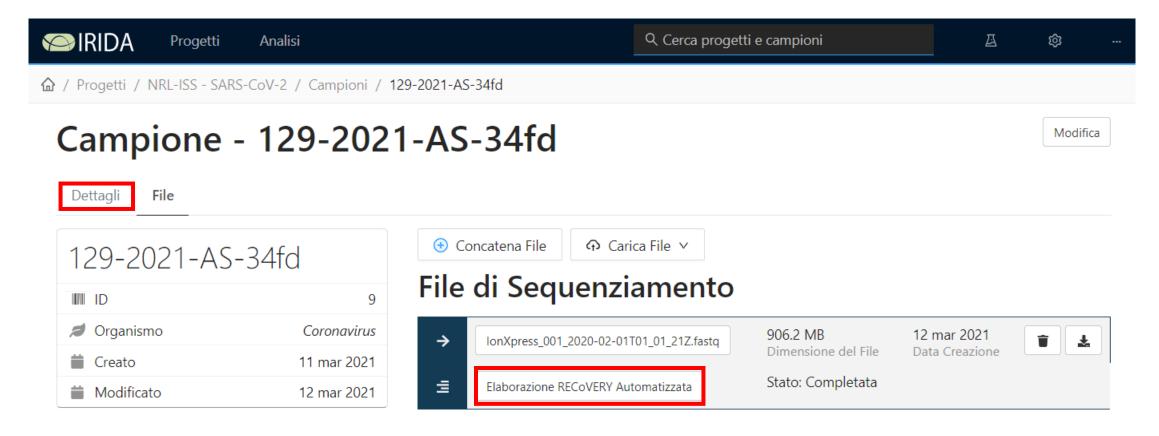
Selezionato il/i file, partirà il caricamento. Non bisogna uscire dalla pagina in questa fase.

Workflow in Esecuzione



Al compimento dell'elaborazione dei file, verrà avviata l'analisi con il workflow RECoVERY. Lo stato viene Impostato a «In Esecuzione» e in questa fase si può uscire dalla pagina senza problemi.

Workflow Completato



Quando il workflow RECoVERY ha eseguito l'elaborazione, lo stato cambia a «Completata». Selezionando la scheda «Dettagli» si possono vedere i risultati sinottici, invece premendo il pulsante «Elaborazione RECoVERY Automatizzata» si passerà alla pagina dei risultati completi.

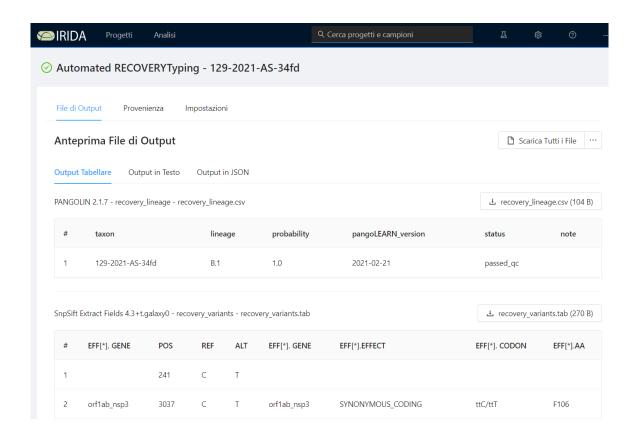
Metadati Analitici

Altri Metadati	
Anno 2021	Sample_code 129-2021-AS-34fd
ORF6	ORF10
=	=
ORF8	Regione
=	Toscana
M-protein	N-protein
=	=
Lineage	ORF1ab
B.1 (1.0)	F106; L323;
E-protein	S-protein
=	D614G;
ORF7a	ORF7b
=	=
ORF3a	QC_status
=	Passed

La scheda dei Metadati Campione ora contiene anche i metadati analitici risultato dell'analisi RECoVERY. Per ogni ORF sono indicate le mutazioni trovate e la lineage determinata con Pangolin.

Workflow Risultati

- 1. Consensus
- 2. Varianti + statistiche
- 3. Lineage
- 4. Metadati analitici
- 5. QualiMap



La pagina con i dettagli dell'analisi invece contiene il file con la sequenza di consensus, una tabella con le mutazioni, il risultato completo di Pangolin, i metadati analitici e i risultati del controllo di qualità. Tutti i Risultati sono direttamente scaricabili.

Workflow Risultati (2)

File di Output Provenienza impostazioni	
Anteprima File di Output	Scarica Tutti i File
Output Tabellare Output in Testo Output in JSON	
Tabular-to-FASTA 1.1.1 - recovery_annotated - recovery_annotated.fasta	스 recovery_annotated.fasta (28.6 kB)
ORF10 ATGGGCTATATAAACGTTTTCGCTTTTACGATATATAGTCTACTCTTGTGCAGAATGAAT	NACAAAGACGGCATCATATGGGTTGCAACTG TTCAAGAAATTCAACTCCAGGCAGCAGCAAA AACGTACTGCCACTAAAGCATACAATGTAAC ACGTGGTTGACCTACACAGGTGCCATCAAAT TGCTGCAGATTTGGATGATTCTCCAAACAA
ivar covid consensus 3.1+galaxy0 - recovery_consensus - recovery_consensus.fasta	
>7465 AACAAACCAACCTTCGATCTCTTGTAGATCTGTTCTCTAAACGAACTTTAAAATCTGTGTGGCTGCACTCGGCTGCATGCTTAGTGCACTCACGCAGTATAATTAAT	TTAAAGATGGCACTTGTGGCTTAGTAGAAG ATACCAGTGGCTTACCGCAAGGTTCTTCTT ATACACTCGCTATGTCGATAACAACTTCTG ATGAATTGCAGACACCTTTTGAAATTAAAT CCTTCAACTCCTATGAAGTGTGATCATTGT

La pagina con i dettagli dell'analisi mostra un anteprima dei file tabellari e di testo. I dati del controllo di qualità e le statistiche delle varianti sono disponibili come archivi zippati e devono essere scaricati per essere visualizzati con qualsiasi browser.

Workflow Risultati (3)

File di Output Provenienza Impostazioni	
Anteprima File di Output	🗅 Scarica Tutti i File
Output Tabellare Output in Testo Output in JSON	
RECoVJ 3.1 - recovery_type - recovery_type.json	♣ recovery_type.json (559 B)
information_name 21016008_S26	
region Sicilia	
year 2021	
sequence Illumina	

Il file json con i risultati analitici è lo stesso che viene inviato per email a fine elaborazione.

Workflow Provenienza

File di Output Provenienza Impostazioni

Provenienza

> recovery_qc.zip

> recovery_consensus.fasta

> recovery_annotated.fasta

> recovery_variants.tab

> recovery_minority_report.tab

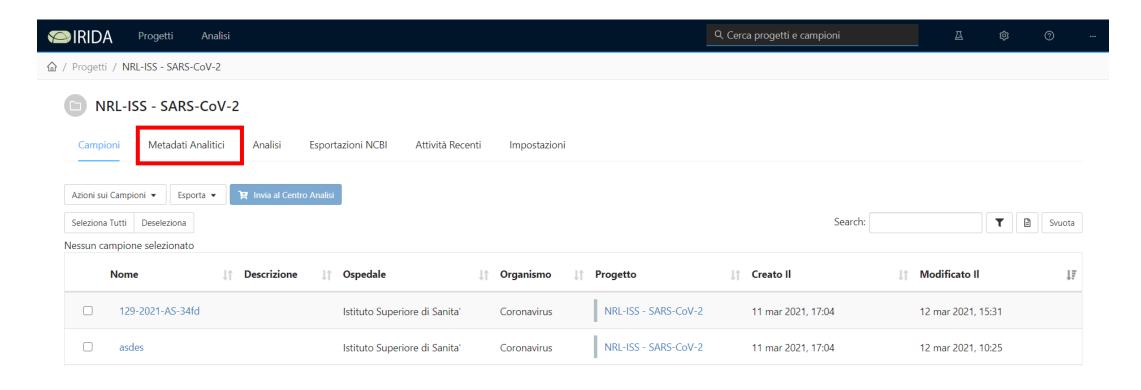
> recovery_variants_stats.zip

> recovery_lineage.csv

> recovery_type.json

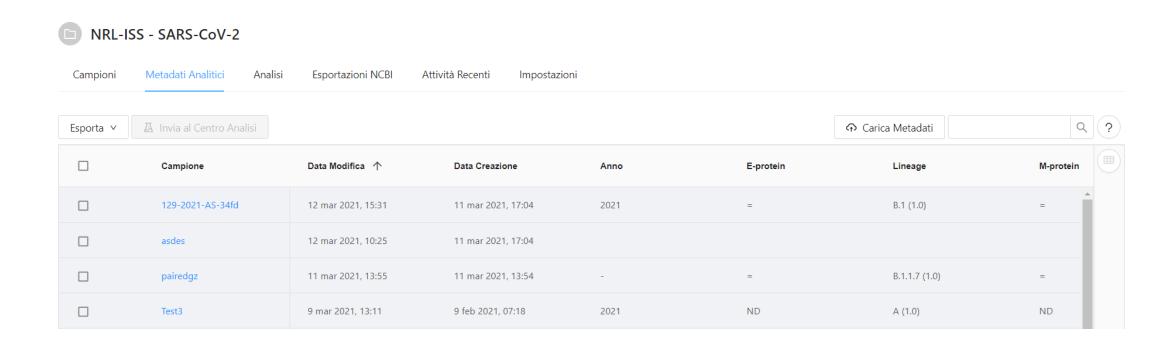
Sulla scheda «Provenienza» si può ispezionare il percorso del workflow che ha portato a ogni risultato.

Progetto Campioni



Per una visione dell'insieme dei campioni, si può selezionare la scheda «Metadati Analitici» nella pagina del Progetto Regionale.

Progetto Metadati Analitici



Nella scheda «Metadati Analitici» sono elencati tutti campioni inseriti in modalità tabellare con associati i loro metadati analitici. La tabella dà una visione dell'insieme dei risultati e inoltre l'opportunità di applicare filtri alle colonne al fine di ottenere una prima impressione di tendenze. I campioni filtrati possono essere selezionati per analisi più approfondite, sia con qualche workflow di IRIDA, sia con qualsiasi software dell'utente scaricandoli.

Invio batch mediante ftps

- L'accesso avviene mediante l'account fornito per l'ftps che è diverso dall'account di IRIDA-ARIES
- Bisogna preparare un pacchetto di invio (tar o zip) che contiene un file csv con l'elenco dei file di sequenze da inviare + i file stessi (file individuali, non un file multifasta)
- Il nome del file csv non deve contenere spazi o accenti
- Il file csv deve avere il formato seguente:

Organismo, Regione, Comune, Ospedale, Nome campione, Data campione, Nome file 1, Nome file 2

- Organismo => Coronavirus
- Regione => nome per esteso o codice ISTAT
- Comune => nome del comune
- Ospedale => Nome dell'ospedale
- Nome campione => univoco
 - => composto da solo lettere, numeri e i seguenti simboli _ ! @ # \$ % ~ `
 - => spazi e tabulazioni non sono ammessi
- Data campione => formato aaaa-mm-gg (a.e. 2021-01-25)
- Nome file 1 => senza spazi, con estensione .fastq, .fastq.gz o .fasta
- Nome file 2 => presente solo nel caso di dati paired-end, il reverse di file 1

In funzione della tipologia di file che si manda, ogni riga conterrà dunque sette o otto campi divisi da virgola.

Pacchetto di invio

Archivio *.tar o *.zip con file csv di riepilogo e file di sequenze (per file oltre 4 GB solo archivi *.tar)

Nome	Dimensione
batch.csv	300
sequence-1.fastq.gz	887
S_Test.fasta	3 926
test_1.fastq	319 968 723
test_SARS_CoV2_paired_1_R1_001.fastq	4 528 999
test_SARS_CoV2_paired_1_R2_001.fastq	4 530 159
test_SARS_CoV2_paired_1_R1_001.fastq	4 528 999

Nel file csv ogni riga riporta:

- Nome dell'organismo
- Nome della Regione (o codice ISTAT)
- Nome del Comune
- Nome dell'Ospedale
- Nome univoco del campione
- Data del campione
- Nome File 1
- Nome File 2 (solo se paired-end reads)

🔚 batch.csv 🔀

¹ Coronavirus, Regione, Comune, Ospedale, S Test, 2021-01-03, S Test. fasta

² Coronavirus, Regione, Comune, Ospedale, Seq2-batch, 2021-02-08, sequence-2.fasta

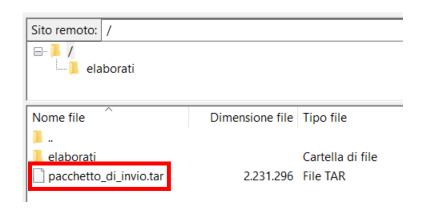
³ Coronavirus, Regione, Comune, Ospedale, Paired_gz, 2021-02-11, test_SARS_CoV2_paired_1_R1_001.fastq.gz, test_SARS_CoV2_paired_1_R2_001.fastq.gz

Impostazioni per ariesftp.iss.it

Protocollo:	FTP - Protocollo trasferimento file		~
Host:	ariesftp.iss.it	Porta:	
Criptazione:	Richiedi FTP esplicito su TLS		~
Tipo di accesso:	Normale		~
Utente:	Nome utente per ftps		
Password:	•••••		

Come software per il caricamento può essere usato qualsiasi programma che supporti il protocollo FTPS (File Transfer Protocol with Explicit Security). Il nome utente e la password sono specifici per questo sistema e diversi da quelli della piattaforma IRIDA-ARIES.

Modalità del trasferimento ftps



Caricamento del pacchetto di invio nella cartella radice



Controllo del pacchetto di invio e creazione di una sottocartella lavoro_[data e ora] nella cartella «elaborati». Creazione del rapporto nella cartella «elaborati» e spostamento del pacchetto di invio nella nuova sottocartella.

La struttura del sito è una cartella radice che contiene una sottocartella: «elaborati». I file di archivio «pacchetto di invio» dovranno essere caricati nella cartella radice (/). Entro 5 minuti, il sistema eseguirà un controllo del contenuto del file e creerà nella cartella «elaborati» un rapporto del risultato in un file con il nome rapporto_[data e ora del controllo].txt. Inoltre creerà nella cartella «elaborati» una sottocartella con il nome lavoro_[data e ora del controllo] nella quale sposterà il file di archivio che in seguito verrà eliminato.

Rapporto del controllo

rapporto_20210219154001.txt

File Modifica Formato Visualizza ?

Nome del pacchetto di invio: pacchetto_di_invio.tar impronta SHA1: 89aede10431eb30d36c0cdb65d20e7f63ab0a04c Riga 1: OK Riga 2: OK Riga 3: OK Riga 4: OK

Il file di rapporto contiene il nome del pacchetto di invio, la sua impronta SHA1 e il risultato del controllo di ogni riga del file csv inviato. Se il risultato è OK, il campione è stato inviato a IRIDA-ARIES, in caso di irregolarità ne viene indicato il motivo. L'utente dovrà correggere le irregolarità e creare un pacchetto di invio per i soli campioni non elaborati.

Analisi del pacchetto di invio

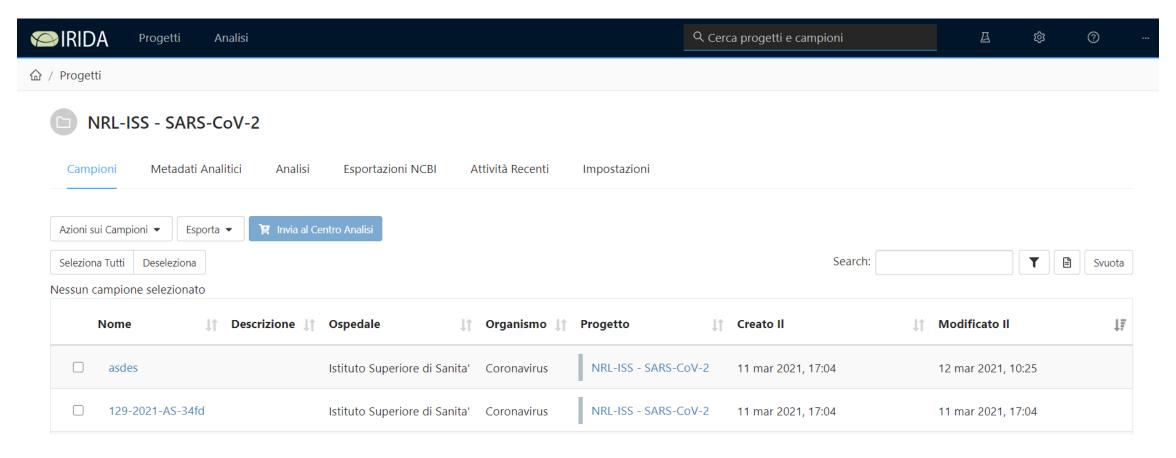
- I campioni indicati nelle righe valide del pacchetto di invio vengono inviati alla piattaforma IRIDA-ARIES e analizzati.
- A fine analisi verrà inviata un'e-mail con allegato un file in formato json contenenti i risultati analitici sinottici a tutti i membri del Progetto Regionale. Il file json può essere letto con un qualsiasi editore di testo.
- Il campione viene aggiunto nel Progetto Regionale in IRIDA-ARIES e lì tutti i risultati completi possono essere visualizzati e scaricati dai membri del Progetto Regionale.

Invio consensus a GISAID

- Al fine di permettere alla piattaforma di inviare campioni a GISAID, l'utente dovrà comunicare la proprio utenza all'ISS (solo username).
- L'ISS comunicherà a GISAID lo username e appena riceverà il via libera da GISAID, avvertirà l'utente.
- Il campo «submitter» avrà lo username dell'utente.
- Il campo «covv_virus_name» avrà il nome del campione inserito tra le stringhe richieste da GISAID: hCov-19/Italy/[nome campione]/2021
- Il campo «covv_authors» per ora è composto dal nome dell'utenza ICOGEN. Verrà predisposta la possibilità di comunicare una lista di autori fissi per ogni combinazione:

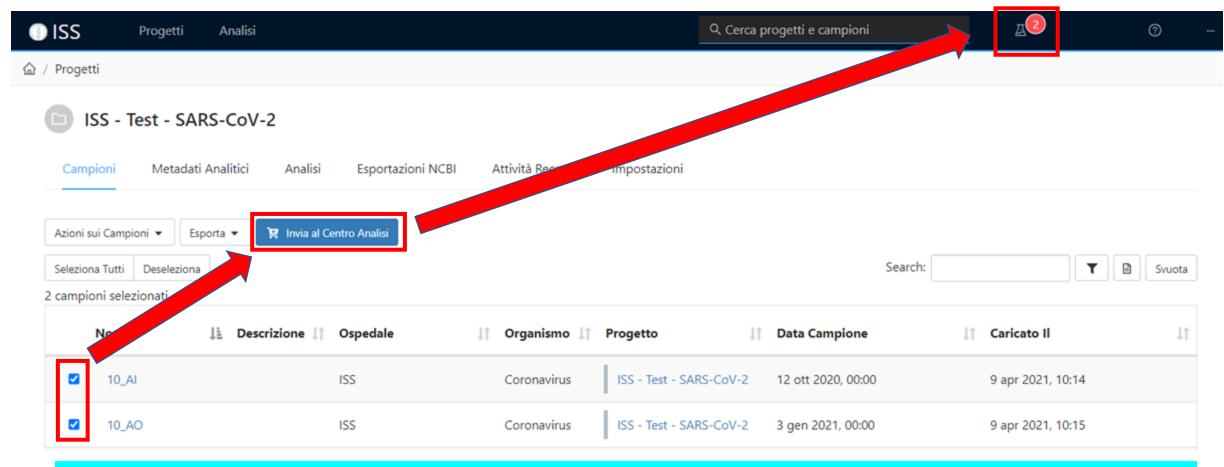
Laboratorio di sequenziamento - Ospedale di raccolta campione

Progetto Regionale



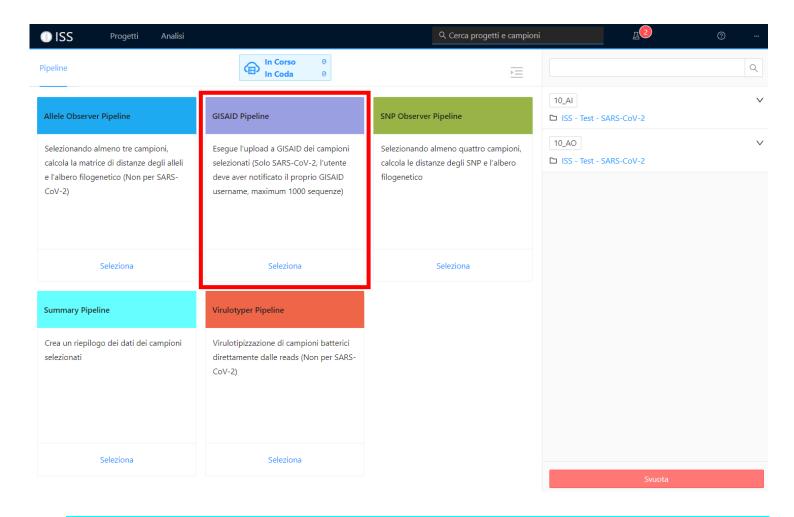
Nella pagina del Progetto Regionale nella scheda «Campioni» bisogna selezionare i campioni da inviare a GISAID.

Invia al Centro Analisi



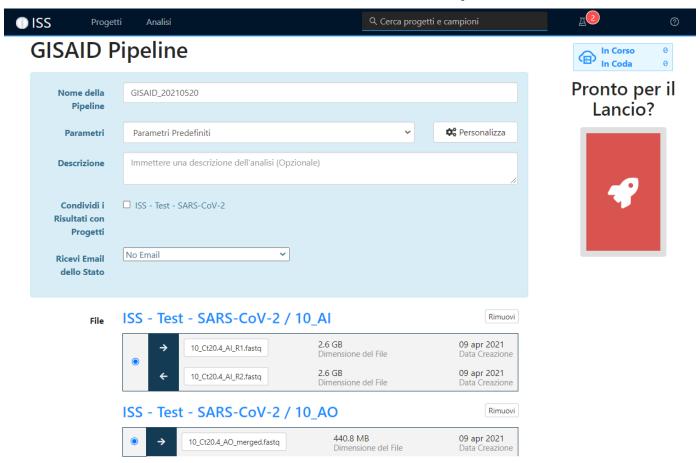
Nella pagina del Progetto Regionale nella scheda «Campioni» bisogna selezionare i campioni da inviare a GISAID. I campioni selezionati possono essere inviati al Centro Analisi mediante il pulsante blu. Accanto all'icona del Beaker in alto a destra si possono vedere il numero di campioni inseriti. Cliccando sulla stessa icona si passa alla finestra del Centro Analisi. Solo i campioni caricati dal proprio Laboratorio verranno presi in considerazione per l'invio.

Centro Analisi



Nella pagina del Centro Analisi bisogna selezionare la «GISAID Pipeline».

Avvio GISAID Pipeline



Nella pagina della GISAID Pipeline si avvia l'invio premendo il pulsante rosso con il razzo.

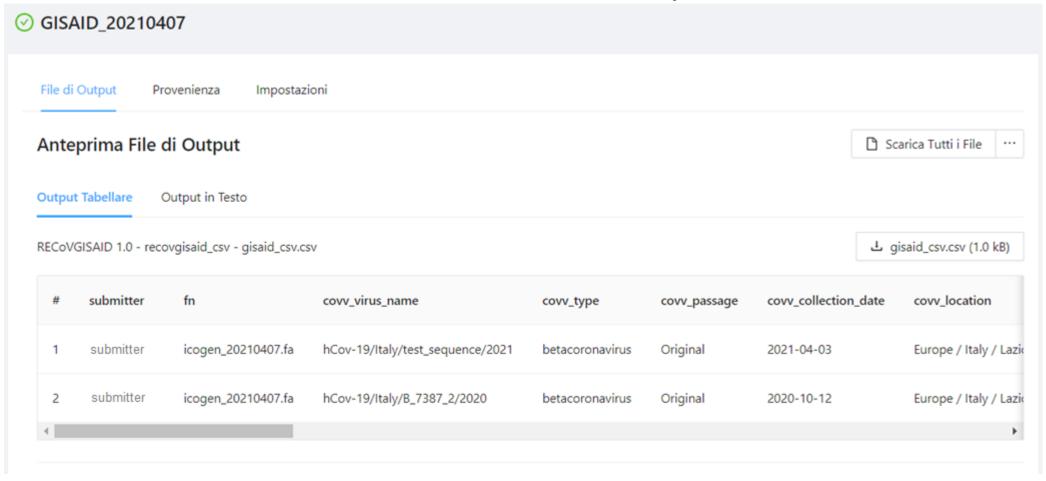
Avvio GISAID Pipeline



Dopo la preparazione della pipeline, essa verrà avviata e selezionando il pulsante «Mostra lo stato della pipeline» si passa alla pagina «Analisi» dove è elencata l'elaborazione, prima nello Stato «In Esecuzione» e poi nello Stato «Completata».

Cliccando sul nome dell'analisi si passa alla pagina dei risultati dell'analisi.

Risultato GISAID Pipeline



Nella scheda «Output Tabellare» si trova il file csv usato per l'invio.

Risultato GISAID Pipeline

Output labellare Output in Testo	
RECOVGISAID 1.0 - recovgisaid_result - gisaid_result.txt	≟ gisaid_result.txt (141 B)
hCov-19/Italy/test_sequence/2021; EPI_ISL_1499573 hCov-19/Italy/B_7387_2/2020; EPI_ISL_1499574 submissions uploaded: 2 submissions failed: 0	
141 B / 141 B (100.0%)	
RECoVGISAID 1.0 - recovgisaid_fasta - gisaid_fasta.fasta	⊥ gisaid_fasta.fasta (58.3 kB)
>hCov-19/Italy/test_sequence/2021 NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN	GTTTCAACGAGAAAACACACGTC GGCTTAGTAGAAGTTGAAAAAGG GTACGGTCGTAGTGGTGAGACAC AGTCATTTGACTTAGGCGACGAG GTCGATAACAACTTCTGTGGCCC ICTGCCGTGAACATGAAA

Nella scheda «Output in Testo» si trovano il file multifasta usato per l'invio e la risposta di GISAID. Il codice GISAID viene aggiunto per ogni campione al campo «Descrizione del Campione».

Informazione

• Richieste di informazione possono essere inviate all'indirizzo e-mail:

helpdesk.icogen@iss.it