

## تشخیص افتراقی ساب تایپ‌های مختلف ویروس آنفلوانزا تایپ A با استفاده از روش RT-PCR-RFLP

زهرا گودرزی<sup>1</sup>، علی نجفی<sup>2</sup>، اسماعیل صابر فر<sup>3\*</sup>

1- کارشناس ارشد ویروس شناسی، مرکز تحقیقات کاربردی ویروس شناسی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...، تهران، ایران

2- کارشناس ارشد بیولوژی مولکولی، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...، تهران، ایران

3- دانشیار، مرکز تحقیقات کاربردی ویروس شناسی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 90/11/15 تاریخ پذیرش: 91/3/24

### چکیده

**زمینه و هدف:** ویروس آنفلوانزای تایپ A یکی از مهم‌ترین عوامل ویروسی بیماری‌های تنفسی است. تغییرات ژنتیکی این ویروس باعث بروز اپیدمی‌های جدید در سرتاسر دنیا می‌شود. از این رو وجود یک تکنیک تشخیصی دقیق به منظور تشخیص سریع سویه‌های در حال گردش ضروری می‌باشد. این مطالعه با هدف به کارگیری یک روش سریع جهت افتراق ساب تایپ‌های ویروس آنفلوانزا تایپ A انجام گرفت.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی واکنش RT-PCR با استفاده از جفت پرایمر اختصاصی ژن ماتریکس بر روی ساب تایپ‌های H9N2 و H5N1، H3N2، H1N1 ویروس آنفلوانزا انجام شد. سپس محصول PCR تحت تاثیر هضم آنزیمی آنزیم‌های آندونوکلاز اختصاصی هر ساب تایپ قرار گرفت.

**یافته‌ها:** نتایج به دست آمده از واکنش RT-PCR نشان داد که جفت پرایمر مربوط به ژن ماتریکس کاملاً اختصاصی بوده و قادر به تکثیر کلیه ساب تایپ‌های مورد مطالعه می‌باشد. همچنین در اثر واکنش هضم آنزیمی بر روی قطعات تکثیر یافته از ژن ماتریکس مربوط به ساب تایپ‌های مختلف، الگوی‌های متفاوتی بر اساس طول قطعات (RFLP) به دست آمد.

**نتیجه‌گیری:** واکنش RT-PCR ویروس آنفلوانزا به همراه RFLP بر اساس ژن ماتریکس می‌تواند روش مناسبی جهت شناسایی ساب تایپ‌های مورد مطالعه ویروس آنفلوانزای تایپ A باشد.

**واژگان کلیدی:** تشخیص افتراقی، ویروس آنفلوانزای تیپ A، واکنش زنجیرهای پلی مراز، RFLP

\*نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، مرکز تحقیقات کاربردی ویروس شناسی

## مقدمه

را انجام داد. هم‌چنین در موارد بروز اپیدمی وجود یک سیستم تشخیصی سریع و دقیق ضرورت پیدا خواهد کرد. تا به حال روش‌های مولکولی متعددی به منظور شناسایی و بررسی اختلافات ژنتیکی ساب تایپ‌های مختلف ویروسی به منظور تفکیک آنها از یکدیگر به کار گرفته شده است (10-12). هدف ما از انجام این مطالعه طراحی یک سیستم سریع و ساده برای تعیین ساب تایپ‌های رایج ویروس آنفلوانزای تایپ A می‌باشد که از طریق آن بتوان بر اساس تغییرات ژن M، ویروس‌های رایج و شایع را شناسایی و تفکیک کرد.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، استرین‌های ویروس آنفلوانزای A (H1N1)/Tehran/49/2001 از واحد آنفلوانزای انستیتو پاستور ایران و استرین‌های A/Tehran/82/79/(H3N2) و A/Chicken/Iran/11/99/(H9N2) و A/Turkey/England/50-92/91/(H5N1) از آزمایشگاه رفرانس سازمان دامپزشکی کشور دریافت شد و به عنوان استرین‌های مرجع مورد استفاده قرار گرفت. با استفاده از کیت تجاری RNX<sup>TM</sup>-Plus (سیناژن - ایران)، RNA ویروس از 100-150 میکرولیتر سوسپانسیون ویروسی، طبق دستورالعمل کیت استخراج گردید و در نهایت RNA استخراج شده در 50 میکرولیتر بافر EDTA به غلظت 1 میلی مولار جدا شد.

## واکنش زنجیره‌ای پلی مراز

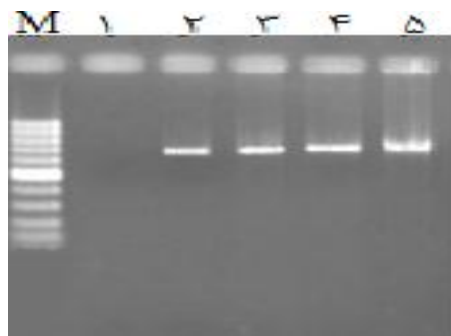
تکنیک ژن M ویروس‌های مورد مطالعه در طی دو مرحله واکنش RT-PCR انجام شد (10). واکنش رونویسی معکوس در حجم کلی 20 میکرولیتر انجام شد که شامل 200 نانوگرم/ میکرولیتر RNA استخراج شده، 10 پیکو مولار پرایمر پیشرو، dNTP با غلظت 10 میلی مولار، بافر 5x، 20 واحد آنزیم Ribonuclease Inhibitor و 40 واحد آنزیم رونوشت بردار معکوس بوده و به مدت 45 دقیقه در دمای 42 درجه سانتی گراد قرار داده شد.

ویروس آنفلوانزای تایپ A گسترش جهانی داشته و همه ساله موجب بروز اپیدمی‌های متعددی در سراسر دنیا می‌شود. ژنوم ویروس آنفلوانزای A از 8 قطعه RNA تشکیل شده است که پروتئین‌های پلی مرز (PB1, PB2, PA)، نوکلئوکپسید (NP)، هماگلوئینین (HA)، نور آمینداز (NA)، پروتئین‌های غیر ساختمانی و ماتریکس (M) را کد می‌کند (1). قطعه قطعه بودن ژنوم توانایی نوتریبی ژنتیکی را به این ویروس داده است. بنابراین آلودگی هم زمان یک میزبان با دو ویروس متمایز می‌تواند منجر به پدید آمدن ویرونی‌های هیبرید شود (2-5). بدین ترتیب تغییرات آنتی ژنی در سطح این ویروس‌ها پدیدار شده که با بروز اپیدمی و پاندمی‌های متعدد در سراسر جهان همراه است. پاندمی‌های آنفلوانزا مربوط به سال‌های 1957 و 1968 که به ترتیب در آسیا و هنگ کنگ اتفاق افتاد، در اثر پدیده نوتریبی ژنتیکی بین سویه‌های انسانی و پرندگان ایجاد شد. در طی این پدیده ژن‌های HA و PB1 و احیاناً ژن NA سویه انسانی به وسیله ژن‌های مربوطه از سویه‌های ویروس آنفلوانزای پرندگان جایگزین شده (6) و بدین ترتیب ویروس نوتریبی پدیدار شد که حاوی ژن‌های HA و NA جدید بوده و توانایی انتقال از انسان به انسان را کسب نمود.

ویروس‌های آنفلوانزای تایپ A بر اساس تفاوت‌های ژنتیکی و آنتی ژنتیکی گلیکوپروتئین‌های سطحی، به ساب تایپ‌های متفاوتی تقسیم می‌شوند. تا به حال 15 ساب تایپ بر اساس هماگلوئینین و 9 ساب تایپ بر اساس نور آمینداز شناسایی شده است (7، 8). همه ساب تایپ‌های نامبرده تا به حال از پرندگان جدا شده است اما فقط ساب تایپ‌های H1N1، H2N2 و H3N2 از جوامع انسانی جدا شده‌اند (1، 9).

پایش و مطالعه ویروس‌های آنفلوانزا در جامعه بسیار حائز اهمیت است زیرا از این طریق می‌توان ساب تایپ‌های در حال گردش را شناسایی کرده و به منظور جلوگیری از اثرات سوء اقتصادی و اجتماعی اقدامات لازم

استرین های مرجع استفاده گردید. از تکثیر ژن M مربوط به ساب تایپ های H9N2، H5N1، H3N2، H1N1 و الکتروفورز محصول RT-PCR، قطعه ای به طول 699 جفت باز به دست آمد (شکل 1).



شماره 1. ژل الکتروفورز محصول RT-PCR

M: مارکو 100 کیلوبازی، ستون 1: کنترل منفی، ستون 2: ژن M ساب تایپ H1، ستون 3: ژن M ساب تایپ H3، ستون 4: ژن M ساب تایپ H5، ستون 5: ژن M ساب تایپ H9. (طول همه قطعات 699 جفت باز)

### نتایج برش آنزیمی

نتیجه برش آنزیمی قطعه M تکثیر یافته مربوط به ساب تایپ های H9N2، H5N1، H3N2، H1N1 با هر یک از آنزیم های Csp6I، AgeI، ScaI، HindIII مشخص شد. قطعه M در ساب تایپ H1N1 توسط آنزیم HindIII در جایگاه A'AGCT\_T (181) برش خورده و دو قطعه به طول های 181 و 518 جفت باز حاصل شد. قطعه هدف در ساب تایپ H3N2 توسط آنزیم ScaI توالی AGT'ACT را در جایگاه 555 برش داده و دو قطعه به طول های 555 و 144 جفت باز ایجاد شد. قطعه M در ساب تایپ H5N1 به وسیله آنزیم AgeI توالی A'CCGG\_T در جایگاه 238 برش خورده و دو قطعه به طول های 238 و 461 جفت باز حاصل شد و در نهایت آنزیم Csp6I، قطعه مورد مطالعه در ساب تایپ H9N2، توالی G'TA\_C را در دو جایگاه 514 و 415 برش داده و بدین ترتیب سه قطعه به طول های 415، 99 و 185 جفت باز ایجاد شد (جدول 2 و شکل 2).

در این مطالعه از جفت پرایمر 5'-P1:CTCATGGAATGGCTAAAGACA-3' و 3'-P2:CGATCAAGAATCCACAATATC-3' استفاده گردید (5). پرایمرهای مورد استفاده قطعه ای از ژن M را تکثیر می نمایند. این ناحیه از ژن ماتریکس، به صورت تقریباً حفاظت شده در تمامی ویروس های آنفلوئزای A موجود بوده و می تواند جهت جدا سازی اکثر ساب تایپ های این ویروس به خوبی مورد استفاده قرار گیرد. ویژگی و اختصاصیت این پرایمرها با استفاده از نرم افزارهای مولکولی BLAST و Oligo و دیگر نرم افزارهای بیوانفورماتیکی که به صورت Online در اینترنت در دسترس هستند، مورد بررسی قرار گرفت. نقشه برشی منطقه تکثیر شده در هر چهار ساب تایپ توسط نرم افزار Geneious مشخص گردید و پس از ارزیابی آنزیم های برش دهنده مختلف بر روی ساب تایپ های مورد مطالعه، آنزیم های برشی HindII، ScaI، AgeI و Csp6I برای هر ساب تایپ انتخاب گردید. سپس واکنش هضم آنزیمی قطعات DNA تکثیر یافته مربوط به هر ساب تایپ طبق دستورالعمل جدول 1 انجام گرفت. در نهایت قطعات به دست آمده روی ژل آگارز 2 درصد منتقل گردید و بعد از رنگ آمیزی با ژل اتیدیوم بروماید توسط دستگاه ترانس لومیناتور مشاهده گردید.

جدول 1. مواد لازم برای واکنش هضم آنزیمی

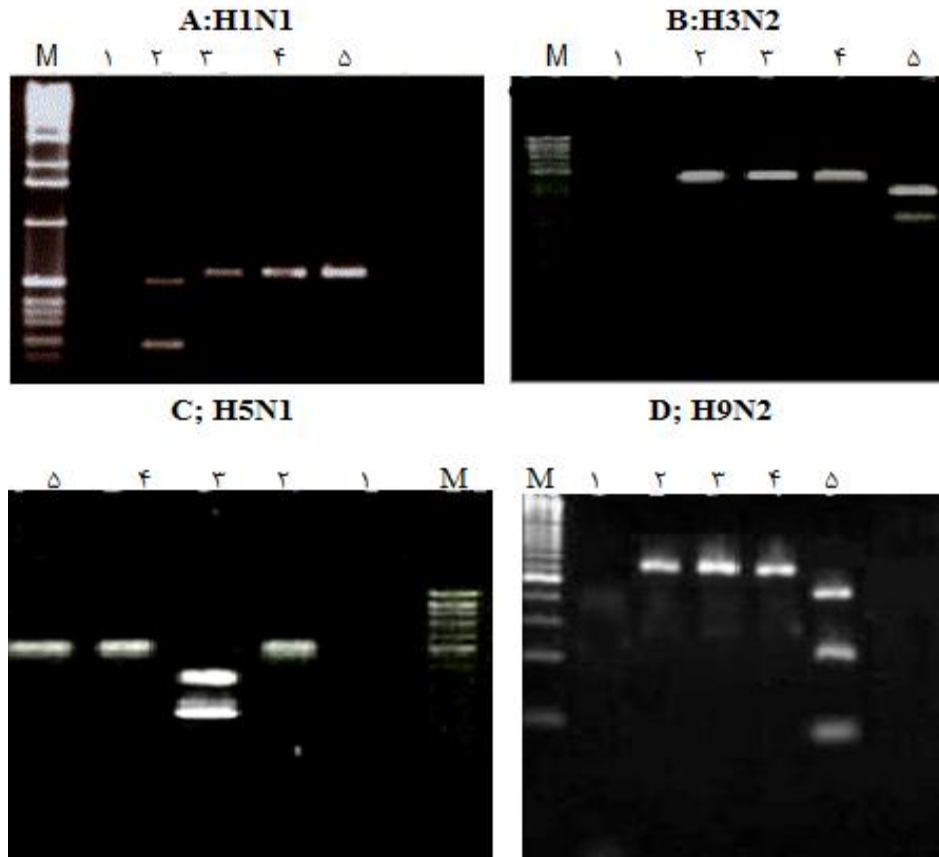
مواد	حجم	دما	زمان
محصول PCR	6 میکرولیتر	65°C	3 ساعت
آنزیم برش دهنده	1 میکرولیتر		
(10x) بافر	2/5 میکرولیتر		
آب مقطر	15/5 میکرولیتر		
حجم نهایی	25 میکرولیتر		

### یافته ها

در این مطالعه از استرین های ویروسی A/Tehran/49/2001/(H1N1)، A/Tehran/82/79/(H3N2) و A/Chicken/Iran/11/99(H9N2) و A/Turkey/England/50-92/91(H5N1) به عنوان

جدول 2. آنزیم های اختصاصی برش دهنده ساب تایپ های ویروس آنفلوانزا تایپ A

ساب تایپ	آنزیم های اختصاصی ساب تایپ	برش دهنده	محل برش	طول قطعات
H1N1	HindIII		A'AGCT_T	181 و 518 جفت باز
H3N2	ScaI		AGT'ACT	555 و 144 جفت باز
H5N1	AgeI		A'CCGG_T	238 و 461 جفت باز
H9N2	Csp6I		G'TA_C	415 ، 99 و 185 جفت باز



شکل 2. الگوی هضم آنزیمی ژن M مربوط به ساب تایپ های H1N1، H3N2، H5N1 و H9N2 به وسیله آنزیم های اختصاصی نوع ساب تایپ.

A; M : مارکر 100 کیلو بازی، ستون 1: کنترل منفی، ستون 2: ژن M ساب تایپ H1 بعد از هضم آنزیمی، ستون 3: ژن M ساب تایپ H3 (699 bp)، ستون 4: ژن M ساب تایپ H5 (699bp)، ستون 5: ژن M ساب تایپ H9 (699bp)  
 B; M : مارکر 100 کیلوبازی، ستون 1: کنترل منفی، ستون 2: ژن M ساب تایپ H1 (699bp)، ستون 3: ژن M ساب تایپ H9 (699bp)، ستون 4: ژن M ساب تایپ H5 (699bp)، ستون 5: ژن M ساب تایپ H3 بعد از هضم آنزیمی.  
 C; M : مارکر 100 کیلوبازی، ستون 1: کنترل منفی، ستون 2: ژن M ساب تایپ H1 (699bp)، ستون 3: ژن M ساب تایپ H5 بعد از هضم آنزیمی، ستون 4 : ژن M ساب تایپ H3 (699bp)، ستون 5: ژن M ساب تایپ H9 (699 bp).  
 D; M : مارکر 100 کیلوبازی، ستون 1: کنترل منفی، ستون 2: ژن M ساب تایپ H1 (699bp)، ستون 3: ژن M ساب تایپ H3 (699bp)، ستون 4: ژن M ساب تایپ H5 (699bp)، ستون 5: ژن M ساب تایپ H9 بعد از هضم آنزیمی.

## بحث

بیماری ناشی از این ویروس کنترل نشده است. هر چند سال یک بار نوع جدیدی از ویروس آنفلونزا در اثر پدیده نوترکیبی پدیدار شده به سرعت گسترش می یابد به نحوی

علیرغم سرمایه گذاری های عظیم تحقیقاتی و ساخت واکسن های متعدد علیه ویروس آنفلونزا، هنوز

که قبل از هر گونه اقدامی موجب همه گیری جهانی می شود و زندگی میلیون ها نفر را به خطر می اندازد (13).

تشخیص زود هنگام و تعیین خصوصیت واریانت های جدید آنفلوآنزا یکی از اهداف سازمان بهداشت جهانی می باشد. از این رو، دست یابی به تست های سریع که بتواند ویروس های جدید و غیر معمول را شناسایی کند ضرورت پیدا می کند. از آنجا که روش الگوی های متفاوت طول قطعات ناشی از هضم آنزیمی (RFLP) از لحاظ هزینه و سرعت انجام کار به صرفه می باشد در این پروژه از این تکنیک برای افتراق ساب تایپ های اصلی و مهم ویروس آنفلوآنزا یعنی H1N1، H3N2، H5N1 و H9N2 استفاده شده است. علت این که ما در این پروژه قطعه ژنی M را به عنوان هدف انتخاب کردیم این است که این قطعه نسبت به سایر ژن های ویروس آنفلوآنزا کمتر دستخوش تغییرات و موتاسیون های نقطه ای قرار می گیرد (14). هم چنین سایت ها و نواحی منحصر به فردی در این ژن وجود دارد که احتمالاً در تروپیسیم ویروس به میزبان نقش داشته و در هر یک از ساب تایپ های آنفلوآنزا تقریباً ثابت هستند (14، 15). از این رو همان طور که در قسمت نتایج دیده شد هر یک از ساب تایپ ها دارای یک نقشه برشی آنزیمی مخصوص به خود می باشد. به این ترتیب می توان با انتخاب آنزیم مناسب، از این تکنیک برای تشخیص اختصاصی ساب تایپ های ویروس آنفلوآنزا استفاده نمود.

اگرچه میزان تغییرات ژنتیکی ژن M ویروس آنفلوآنزا نسبت به ژن های HA و NA پایین است (6). ولی در طول زمان توالی این ژن ممکن است دست خوش تغییرات گردد. به همین دلیل لازم است که در انتخاب پرایمر و آنزیم های آندونوکلئاز دقت شود. به هر حال از مزایای روش مورد استفاده این است که از ناحیه حفاظت شده ژن M به منظور تکثیر ویروس استفاده شده است در نتیجه می توان طیف وسیعی از ویروس های آنفلوآنزای در گردش را شناسایی کرد و هم چنین با استفاده از این تست می توان ساب تایپ ویروس های جدا شده از بیماران را بر اساس ژن M تعیین کرد. بنابراین با انجام این تست در آزمایشگاه ها

می توان با هزینه کمتر ویروس جدا شده را مشخص کرد. جدا سازی ساب تایپ های مختلف ویروس آنفلوآنزا بر اساس انواع روش ها مثل کشت سلول و روش های مولکولی از جمله سکانسینگ و multiplex RT-PCR (10) امکان پذیر است. کشت سلول زمان بر است و در مواقعی که شناسایی سریع نوع ویروس اهمیت دارد فاقد ارزش است. روش سکانسینگ پر هزینه بوده و نمی توان از آن به عنوان روش روتین برای شناسایی ویروس های در چرخش استفاده کرد. تکنیک multiplex RT-PCR، روشی است که به طراحی هم زمان چند پرایمر نیاز داشته و در نتیجه بهینه کردن شرایط PCR با وجود پرایمرهای مختلف کار سختی است. روش های سریع، مانند ایمونوفلورسانس و آنزیم ایمنونواسی که برای تشخیص ویروس های آنفلوآنزا در نمونه های بالینی مورد استفاده قرار می گیرند از اختصاصیت و حساسیت متغیری برخوردار هستند.

همان گونه که قبلاً ذکر گردید ویروس آنفلوآنزا دارای تغییرات ژنتیکی زیادی می باشد که این موضوع باعث شده است تا ساب تایپ های متعددی از این ویروس مهلک و خطرناک پدیدار گردد. موتاسیون های ایجاد شده را می توان علاوه بر روش سکانسینگ با استفاده از تکنیک برش آنزیمی مورد ارزیابی و تشخیص قرار داد.

مطالعات مشابه دیگری بر اساس این روش برای تفکیک سویه ها و زیر گونه های عوامل میکروبی در داخل و خارج کشور انجام شده است (19-16). در مورد ویروس آنفلوآنزا در داخل کشور از این روش تا به حال استفاده نشده ولی در خارج از کشور مطالعات مشابه جهت تشخیص ساب تایپ ها و هم چنین جهت تشخیص ساب تایپ های مقاوم به دارو و افتراق آنها از ساب تایپ های حساس به دارو انجام گردیده است (16، 17، 20). همگی این تست ها و نتایج حاصل از آنها حاکی از مورد تأیید و کارآمد بودن روش RT-PCR-RFLP می باشد.

### نتیجه گیری

6. Kawaoka Y, Krauss S, Webster RG. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *Journal of Virology*. 1989; 63(11): 4603-8.
7. Xie Z, Pang Y, Liu J, Deng X, Tang X, Sun J, et al. A multiplex RT-PCR for detection of type A influenza virus and differentiation of avian H5, H7, and H9 hemagglutinin subtypes. *Molecular and cellular probes*. 2006;20(3):245-9.
8. Lee MS, Chang PC, Shien JH, Cheng MC, Shieh HK. Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *Journal of virological methods*. 2001; 97(1):13-22.
9. Webster R, Shortridge K, Kawaoka Y. Influenza: interspecies transmission and emergence of new pandemics. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2006; 18(4):275-9.
10. Saberfar E, Forghani-Fard MM, Mosavi M. Multiplex reverse transcriptase-PCR assay for typing and subtyping of influenza A (H5 & H9) virus in Iran. *Iranian Biomedical Journal*. 2007; 11(2):69-74.
11. Klimov AI, Cox NJ. PCR restriction analysis of genome composition and stability of cold-adapted reassortant live influenza vaccines. *Journal of virological methods*. 1995; 52(1): 41-9.
12. Sakamoto S, Kino Y, Oka T, Herlocher ML, Maassab HF. Gene analysis of reassortant influenza virus by RT-PCR followed by restriction enzyme digestion. *Journal of virological methods*. 1996; 56(2): 161-71.
13. Ojo S, Guffy M. Facial-digital syndrome in purebred angus cattle. *Veterinary medicine, small animal clinician: VM, SAC*. 1975; 70(1):28-9.
14. Ito T, Gorman OT, Kawaoka Y, Bean WJ, Webster RG. Evolutionary analysis of the influenza A virus M gene with comparison of the M1 and M2 proteins. *Journal of Virology*. 1991;65(10):5491-8.
15. Yuki F, Akira S, Taro K, Hitoshi O. Evolution of the M gene of the influenza A virus in different host species: large-scale

بر اساس نتایج به دست آمده می توان نتیجه گرفت که واکنش RT-PCR-RFLP جهت تشخیص ساب تایپ های ویروس آنفلونزا بر اساس ژن M، روش آسان و نسبتاً کم هزینه ای بوده و از آن می توان جهت تشخیص و پایش ویروس های آنفلونزا در سطح کشور استفاده کرد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از کلیه همکاران محترم آزمایشگاه ویروس شناسی کاربردی پژوهشگاه دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله تشکر و قدر دانی می نمایند. این مطالعه در قالب طرح تحقیقاتی به شماره 404-86 و با حمایت مالی معاونت تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله انجام شده است.

### منابع

1. Russell R, Gamblin S, Haire L, Stevens D, Xiao B, Ha Y, et al. H1 and H7 influenza haemagglutinin structures extend a structural classification of haemagglutinin subtypes. *Virology*. 2004; 325(2): 287-96.
2. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological reviews*. 1992; 56(1):152-79.
3. Guan Y, Peiris J, Lipatov A, Ellis T, Dyrting K, Krauss S, et al. Emergence of multiple genotypes of H5N1 avian influenza viruses in Hong Kong SAR. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002; 99(13):8950-5.
4. Sampath R, Russell KL, Massire C, Eshoo MW, Harpin V, Blyn LB, et al. Global surveillance of emerging Influenza virus genotypes by mass spectrometry. *PLoS One*. 2007;2(5):e489.
5. Fereidouni SR, Harder TC, Starick E. Rapid pathotyping of recent H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses and of H5 viruses with low pathogenicity by RT-PCR and restriction enzyme cleavage pattern (RECP). *Journal of virological methods*. 2008; 154(1):14-9.

sequence analysis. *Virology Journal*.2009;6:67-8.

16. Cooper LA, Subbarao K. A simple restriction fragment length polymorphism-based strategy that can distinguish the internal genes of human H1N1, H3N2, and H5N1 influenza A viruses. *Journal of clinical microbiology*. 2000; 38(7):2579-83.

17. Park K, Lee M, Ryu J, Park Y. Evolutionary stasis of M1 gene of human influenza A viruses and the possibility of their subtyping by restriction analysis of M1 gene polymerase chain reaction product. *Acta virologica*. 1997;41(4):231-9.

18. Foddai A, Idini G, Fusco M, Rosa N, De la Fe C, Zinellu S, et al. Rapid differential

diagnosis of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* based on a multiplex-PCR and a PCR-RFLP. *Molecular and cellular probes*. 2005; 19(3):207-12.

19. khosravi A, hashemi A. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains using restriction fragment length polymorphism technique based on hsp65 gene. *J Shahrekord Univ Med Sci*. 2005; 7 (3):1-8.[persian]

20. Saito R, Oshitani H, Masuda H, Suzuki H. Detection of amantadine-resistant influenza A virus strains in nursing homes by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis with nasopharyngeal swabs. *Journal of clinical microbiology*. 2002; 40(1):84-8.

Archive of SID