



## Моноклональные антитела к гемагглютинуину вируса гриппа A/H7N3 (*Orthomyxoviridae: Alphainfluenzavirus: Influenza A virus*)

© Сорокин Е.В.<sup>1</sup>, Царёва Т.Р.<sup>1</sup>, Руднева И.А.<sup>2</sup>, Тимофеев Б.И.<sup>2</sup>, Ляшко А.В.<sup>2</sup>,  
Баланова М.А.<sup>2</sup>, Артёмов Е.К.<sup>2</sup>, Гребенникова Т.В.<sup>2</sup>, Тимофеева Т.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, 197376, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>2</sup>Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, Россия

**Введение.** Варианты вируса гриппа (ВГ) А подтипа Н7, как и Н5, обладают высоким пандемическим потенциалом. Однако имеющиеся сведения об антигенной структуре гемагглютинина (НА) Н7 значительно уступают по объёму аналогичным данным в отношении НА подтипа Н5.

**Цели** исследования – разработка и характеристика панели моноклональных антител (МКАТ), направленных к НА подтипа Н7 возбудителя гриппа А.

**Материал и методы.** Культуру вируса накапливали в 10-дневных куриных эмбрионах. Очистку и концентрацию вирусных частиц, определение концентрации белка, получение МКАТ и асцитных жидкостей, реакцию гемагглютинации (РГА) и реакцию торможения гемагглютинации (РТГА), оценку активности антител в непрямом иммуоферментном анализе (ИФА), а также определение изотипов МКАТ и реакцию нейтрализации (РН) проводили стандартными способами.

**Результаты.** Полученные МКАТ к штамму A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N3) исследованы в РТГА с набором штаммов разных лет выделения, относящихся к различным эволюционным группам. Во всех случаях антитела обладали сниженной реакционной способностью по сравнению с вирусом-иммуногеном. Выявлено перекрёстное взаимодействие МКАТ 9E11 и 9G12 в РТГА с ВГ А/Н15.

**Обсуждение.** Возбудитель гриппа А с НА подтипа Н7 может послужить потенциальным агентом будущей пандемии. Разработка панели МКАТ к НА этого подтипа представляется актуальной задачей как для ветеринарии, так и для общественного здравоохранения.

**Заключение.** Полученные нами антитела могут найти применение не только для эпитопного картирования НА подтипа вируса Н7 (которое к настоящему времени недостаточно разработано) и в качестве реагентов тест-систем, но и с целью определения общих («универсальных») эпитопов в данной молекуле у разных штаммов Н7.

**Ключевые слова:** вирус гриппа А; гемагглютинин Н7; моноклональные антитела; филогенетические деревья

**Для цитирования:** Сорокин Е.В., Царёва Т.Р., Руднева И.А., Тимофеев Б.И., Ляшко А.В., Баланова М.А., Артёмов Е.К., Гребенникова Т.В., Тимофеева Т.А. Моноклональные антитела к гемагглютинуину вируса гриппа А/Н7N3 (*Orthomyxoviridae: Alphainfluenzavirus: Influenza A virus*). *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(3): 189-197. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-45>

**Для корреспонденции:** Тимофеева Татьяна Анатольевна, заведующая лабораторией физиологии вирусов, Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, Россия. E-mail: [timofeeva.tatyana@inbox.ru](mailto:timofeeva.tatyana@inbox.ru)

**Участие авторов:** Сорокин Е.В. – получение и характеристика моноклональных антител, сбор данных, интерпретация результатов работы; Царёва Т.Р. – получение и характеристика моноклональных антител; Руднева И.А. – культивирование вируса гриппа, проведение иммунологических реакций; Тимофеев Б.И. – построение и сравнительный анализ филогенетических деревьев; Ляшко А.В. – проведение иммунологических реакций; Баланова М.А. – характеристика моноклональных антител; Артёмов Е.К. – характеристика моноклональных антител; Гребенникова Т.В. – написание текста, консультативная помощь; Тимофеева Т.А. – идея, концепция и дизайн исследования, сбор данных, интерпретация результатов работы, написание текста, утверждение окончательной версии статьи.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность ведущему инженеру ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Е.Б. Тимофеевой за проведение сравнительного анализа филогенетических деревьев.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.

Поступила 01.02.2021

Принята к печати 11.05.2021

## Monoclonal antibodies to hemagglutinin of influenza A/H7N3 virus (*Orthomyxoviridae: Alphainfluenzavirus: Influenza A virus*)

Evgeniy V. Sorokin<sup>1</sup>, Tatiana R. Tsareva<sup>1</sup>, Irina A. Rudneva<sup>2</sup>, Boris I. Timofeev<sup>2</sup>, Alexander V. Lyashko<sup>2</sup>, Marina A. Balanova<sup>2</sup>, Evgeny K. Artemov<sup>2</sup>, Tatyana V. Grebennikova<sup>2</sup>, Tatiana A. Timofeeva<sup>2</sup>

<sup>1</sup>FSBI «A.A. Smorodintsev Research Institute of Influenza» of the Ministry of Health of Russia, 197376, St. Petersburg, Russia;

<sup>2</sup>D.I. Ivanovsky Institute of Virology of FSBI «National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of Russia, 123098, Moscow, Russia

**Introduction.** Variants of influenza virus A/H7 have the same high pandemic potential as A/H5. However, the information about the antigenic structure of H7 hemagglutinin (HA) is considerably inferior in quantitative terms to similar data for H5 HA.

The **aims** of the study were development and characterization of the monoclonal antibodies (MAbs) panel for HA subtype H7 of the influenza A virus.

**Material and methods.** Viruses were accumulated in 10-day-old chicken embryos. Purification and concentration of the virus, determination of protein concentration, preparation of MAbs and ascitic fluids, hemagglutination and hemagglutination inhibition (HI) tests, assessment of antibodies' activity in indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), as well as determination of MAbs isotypes and neutralization reaction (NR) were carried out by standard methods.

**Results.** The obtained MAbs to A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N3) strain were studied in HI test with a set of strains of different years of isolation belonging to different evolutionary groups. MAbs had a reduced reactivity compared to the immunogen-virus for all the studied strains. Cross-interaction of MAbs 9E11 and 9G12 in HI test with influenza A/H15 virus has been observed.

**Discussion.** Influenza A agent with H7 HA variant could serve as a potential cause of a future pandemic. Development of the MAbs panel for subtype H7 HA is an urgent task for both veterinary medicine and public health.

**Conclusion.** The obtained MAbs can be used not only for epitope mapping of the H7 HA molecule (currently insufficiently studied) and as reagents for diagnostic assays, but also for determining common («universal») epitopes in HA of different strains of this subtype.

**Key words:** *influenza A virus; H7 hemagglutinin; monoclonal antibodies; phylogenetic trees*

**For citation:** Sorokin E.V., Tsareva T.R., Rudneva I.A., Timofeev B.I., Lyashko A.V., Balanova M.A., Artemov E.K., Grebennikova T.V., Timofeeva T.A. Monoclonal antibodies to hemagglutinin of influenza A/H7N3 virus (*Orthomyxoviridae: Alphainfluenzavirus: Influenza A virus*). Problems of Virology (*Voprosy Virusologii*). 2021; 66(3): 189-197 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-45>

**For correspondence:** Tatiana A. Timofeeva, Head of the Laboratory of Virus Physiology, D.I. Ivanovsky Institute of Virology FSBI «National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of Russia, 123098, Moscow, Russia. E-mail: [timofeeva.tatyana@inbox.ru](mailto:timofeeva.tatyana@inbox.ru)

### Information about the authors:

Sorokin E.V., <http://orcid.org/0000-0003-1732-1727>

Tsareva T.R., <http://orcid.org/0000-0003-4757-0521>

Rudneva I.A., <https://orcid.org/0000-0001-5000-2547>

Timofeev B.I., <https://orcid.org/0000-0001-7425-0457>

Lyashko A.V., <https://orcid.org/0000-0001-5714-9461>

Balanova M.A., <https://orcid.org/0000-0003-4151-4123>

Artemov E.K., <https://orcid.org/0000-0002-6786-6357>

Grebennikova T.V., <http://orcid.org/0000-0002-6141-9361>

Timofeeva T.A., <http://orcid.org/0000-0002-8991-8525>

**Contribution:** Sorokin E.V. – obtaining and characterization of monoclonal antibodies, data collection, interpretation of research results; Tsareva T.R. – obtaining and characterization of monoclonal antibodies; Rudneva I.A. – cultivation of the influenza virus, conducting of immunological reactions; Timofeev B.I. – design and comparative analysis of phylogenetic trees; Lyashko A.V. – conducting immunological reactions; Balanova M.A. – characterization of monoclonal antibodies; Artemov E.K. – characterization of monoclonal antibodies; Grebennikova T.V. – writing of the text, consultations; Timofeeva T.A. – idea, research concept and design, data collection, interpretation of research results, writing of the text, approval of the final version of the article.

**Acknowledgement.** The study had no sponsorship.

The authors express their gratitude to the Leading Engineer of FSBI «National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya» E.B. Timofeeva, for conducting a comparative analysis of phylogenetic trees.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the D.I. Ivanovsky Institute of Virology FSBI «National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of Russia.

Received 01 February 2021

Accepted 11 May 2021

## Введение

Вирус гриппа (ВГ) с гемагглютинином (НА) подтипа Н7 впервые идентифицирован в 1955 г. по модели штамма A/chicken/Brescia/1/1902 (H7N7), ставшего причиной крупной эпизоотии в Европе в начале XX в. [1]. Спустя столетие на европейской территории произошла ещё одна вспышка, вызванная вирусом птиц H7N7, при которой были также случаи поражения людей [2, 3]. Затем с февраля 2013 г., а именно в начале сезона весенней миграции птиц, в Китайской Народной Республике (КНР) возникали спорадические эпизоды заболевания в человеческой популяции, связанные с ВГ птиц подтипа H7N9. Источником большинства подобных случаев были инфицированные домашние птицы, переносившие инфекцию бессимптомно. Массовая гибель птиц тогда не была зарегистрирована, однако выявлено несколько семейных очагов заболевания у людей, все члены семей которых могли контактировать с птицами. Под наблюдением специалистов находились около 2 тыс. человек, имевших контакты с заболевшими, в результате чего была показана ограниченная способность ВГ птиц А (H7N9) передаваться воздушно-капельным путём от человека к человеку. Повышенное сродство этого патогена к клеточным рецепторам «человеческого» типа тоже подтверждает подобную возможность [4]. Таким образом, варианты ВГ А подтипа Н7, как и «печально известного» Н5, также обладают высоким пандемическим потенциалом. Между тем сведения об антигенной структуре гемагглютинаина (НА) Н7 значительно уступают по объёму аналогичным данным в отношении подтипа Н5.

Изложенные факты определяют значимость исследования эволюционной изменчивости и антигенной структуры молекулы НА подтипа Н7. Достижению этой цели может способствовать использование специфичных моноклональных антител (МКАТ). Подобные антитела успешно применяют для типирования ВГ посредством таких простых и доступных иммунологических методов, как реакция нейтрализации (РН) и реакция торможения гемагглютинации (РТГА). МКАТ, полученные к НА Н7, применяются с целью эпитопного картирования этой молекулы изолята А/Н7N9, выделенного в КНР [5–7]. Они также служат ценным исследовательским инструментом в процессе антигенной характеристики новых вирусных штаммов, что при сопоставлении с данными генетического анализа позволяет выявить закономерности эволюционной изменчивости ВГ.

Целями настоящей работы явились разработка и характеристика панели МКАТ, направленных к молекуле НА подтипа Н7 возбудителя гриппа А.

## Материал и методы

**Получение аллантоисной жидкости, содержащей вирус гриппа.** Культивирование ВГ А/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N3), A/FPV/Rostock/34 (H7N1), A/FPV/Weybridge (H7N7), A/Anhui/1/2013 (H7N9), A/Shanghai/2/2013 (H7N9), A/chicken/NJ/294508-12/2004 (H7N2), A/chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2)

[8], A/avian/NJ/273874/2003 (H7N2), A/duck/Moscow/4970/2013 (H1N1), A/duck/Moscow/4182/2010 (H5N3) и A/duck/Australia/341/83 (H15N8) проводили в аллантоисной полости куриных эмбрионов согласно методическим рекомендациям ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Сморodinцева» (НИИ гриппа) Минздрава России [9].

**Очистка и концентрация вируса.** Вирусные частицы из содержащей ВГ А/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N3) аллантоисной жидкости осаждали ультрацентрифугированием при 50 000 g в течение 2 ч и суспендировали в малом количестве (1 мл) 10 мМ Трис-ЭДТА буфера, pH 7,2 (STE). После этого выполняли очистку вируса через градиент 20–60% сахарозы ультрацентрифугированием при 100 000 g в течение 2,5 ч с последующим осаждением вирусных частиц из зоны 36–40% сахарозы на дно при 120 000 g на протяжении 1 ч. Осадок ресуспендировали в буфере STE. Полученную суспензию хранили до исследования в замороженном состоянии при –75 °С.

**Определение концентрации белка.** Концентрацию белка оценивали с помощью набора «BCA™ Protein Assay Kit» («Pierce», США); реакцию проводили в соответствии с инструкцией производителя. Результаты учитывали при длине волны 560 нм на спектрофотометре Multiskan FC («ThermoFisher Scientific», Финляндия). Значения концентрации белка в исследуемых пробах рассчитывали по калибровочной кривой, линейный участок которой соответствовал интервалу концентраций 0,05–2,0 мг/мл по белку.

**Получение моноклональных антител.** МКАТ к вирусу А/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N3) получали по модифицированному методу, описанному ранее [10].

**Получение асцитных жидкостей.** Мышам линии BALB/c, предварительно праймированным при станом (C<sub>19</sub>H<sub>40</sub>) (0,5 мл на особь), внутрибрюшинно вводили гибридные клетки в количестве 3–5 млн на особь. Спустя 2–3 нед асцитную жидкость отбирали из брюшной полости мышей. Исследования выполняли согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ МЗ РФ N 266 от 19.06.2003).

**Реакция гемагглютинации и реакция торможения гемагглютинации.** Реакции гемагглютинации (РГА) и торможения гемагглютинации (РТГА) ставили стандартным методом в соответствии с методическими рекомендациями НИИ гриппа [9]. За титр антител принимали их наибольшее разведение, полностью подавляющее гемагглютинацию 8 ГАЕ вируса (ГАЕ – гемагглютинирующая единица).

**Оценку активности полученных моноклональных антител в непрямом иммунофлуоресцентном анализе** выполняли согласно описанной ранее методике [10].

**Определение изотипов моноклональных антител.** Изотипы МКАТ определяли в ИФА с использованием коммерческого набора «IsoStrip™ Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit» («Sigma», Германия) согласно инструкциям фирмы-изготовителя.

**Оценку нейтрализующей активности моноклональных антител в микрокультуральном иммуно-**

**флуоресцентном анализе** также проводили по описанной ранее методике [10].

**Иммуноблоттинг.** Вирусные белки разделяли при помощи электрофореза в 5–20%-градиентном полиакриламидном геле (ПАГ) в восстанавливающих условиях (с добавлением  $\beta$ -меркаптоэтанола,  $C_2H_6SO$ ) и переносили на нитроцеллюлозную мембрану Millipore толщиной 0,45 мкм («Sigma-Aldrich», США) посредством элюции. Инкубацию МКАТ в блокирующем растворе бычьей фетальной сыворотки (ФСБ), содержащем 5% бычьего сывороточного альбумина (БСА), осуществляли при температуре 37 °С в течение 2 ч, после чего обрабатывали пероксидазным конъюгатом антител к молекулам IgG мыши («Sigma»), разведённым блокирующим буфером в соотношении 1 : 1000, при 37 °С на протяжении 1 ч. Окраску белков на нитроцеллюлозной мембране проводили раствором для блоттинга, содержащим 3,3',5,5'-тетраметилбензидина гидрохлорид (ТМБ) ( $C_{16}H_{20}N_2$ ) с добавлением пероксида водорода ( $H_2O_2$ ).

**Построение филогенетических деревьев вирусов гриппа А подтипа Н7.** При построении деревьев применяли 2 различные программы: FastTree v.2.1.10 [11], в основе которой заложен метод присоединения соседей (neighbor-joining, NJ) с последующим уточнением методами минимальной эволюции (замены ближайшего соседа – nearest neighbour interchange, NNI и обрезки/пересадки ветвей субдеревьев – subtree pruning and regrafting, SPR) и максимального правдоподобия (maximal likelihood estimation, MLE) на матрице замен LG [12], и алгоритм RAxML v.8.2.10 [13], использующий MLE на матрицах замен LG и FLU [14].

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России (Протокол № 13/1 от 21.10.2019).

## Результаты

В результате отбора положительных клонов получена панель из 7 МКАТ (7D11, 7H9, 8A3, 9B2, 9B10, 9E11 и 9G2), специфически взаимодействующих с очищенным концентратом вируса-иммуногена A/mallard/Netherlands/12/2000(H7N3). Согласно данным вестерн-блот анализа все антитела оказались направленными к большой субъединице (НА1) НА (молекулярная масса 57 кДа), что предполагает их взаимодействие с линейными эпитопами данной молекулы [15, 16]. Результаты определения класса и субкласса тяжёлых цепей в составе иммуноглобулина показали, что все МКАТ принадлежали к классу IgG, но к различным его изотипам: в частности, 7D11 к IgG3, 7H9 и 9E11 – к IgG2a, 9B2 и 9B10 – к IgG1. Полученные МКАТ взаимодействовали в ИФА с вирусом A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N3) в диапазоне титров  $10^{-4}$ – $10^{-7}$ . Обнаружено, что антитела 7D11, 7H9

и 9B2 обладали значительной нейтрализующей активностью по отношению не только к вирусу-иммуногену, но и к высокопатогенному штамму A/Anhui/1/2013 (H7N9). Характеристика полученных МКАТ представлена в **табл. 1**.

Для типирования и антигенного анализа вирусных штаммов наиболее широкое применение находит РТГА. Установлено, что все МКАТ обладали выраженной антиагглютинирующей активностью в отношении вируса-иммуногена A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N3) (**табл. 2**). По степени интенсивности взаимодействия в РТГА полученные антитела можно условно разделить на 2 группы: 1) МКАТ (8A3 и 9B10) со средней активностью (титры 1 : 640 – 1 : 1280); 2) МКАТ (7D11, 7H9, 9B2, 9E11 и 9G12) с высокой активностью (титры 1 :  $10^3$  – 1 :  $2 \times 10^3$ ). Полученные антитела исследованы в данной реакции с набором штаммов ВГ подтипа Н7 разных лет выделения, относящихся к различным эволюционным группам (**табл. 2**). Во всех случаях МКАТ обладали сниженной реакционной способностью по сравнению с таковой для вируса-иммуногена. Кроме того, представлялось важным оценить реакционную способность антител с ВГ различных подтипов НА – как эволюционно близких к Н7 (Н15), так и эволюционно удалённых (Н5, Н1) (**рис. 1**) [17]. В результате выявлено перекрёстное взаимодействие 9E11 и 9G12 в РТГА с вирусом А/Н15. С возбудителями подтипов Н5N3 и Н1N1 все полученные нами МКАТ не реагировали.

Чтобы теоретически подтвердить филогенетическую удалённость исследованных штаммов ВГ А/Н7 от использованного нами для получения МКАТ вируса A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N3), проведено построение филогенетических деревьев с использованием базы данных GISAID EpiFlu™ для возбудителей гриппа А с НА подтипа Н7. Для построения деревьев отобрано 4491 полных и полностью определённых аминокислотных последовательностей вирусов с НА Н7, идентифицированных с 1902 по 2020 г., среди которых оказалось 1999 уникальных. Их выравнивание выполнено с помощью программы Clustal Omega [18] и признано нами приемлемым. Как и ожидалось, основные различия в длине последовательностей были обусловлены наличием варибельности в сайте нарезания – между большой (НА1) и малой (НА2) субъединицами молекулы НА.

Полученные деревья сравнивались с аналогичными данными более ранних исследований филогении Н7 [19] и между собой, как визуально, так и с использованием метрики Робинсона–Фулдса [20] при помощи пакета программ Phangorn v.2.5.5 (<https://www.rdocumentation.org/packages/phangorn>). Результаты сравнения (**табл. 3**) показывают хорошее согласие построенных различными методами деревьев Н7, что подтверждает возможность использования их для оценки дистанции между тестируемыми штаммами.

На **рис. 2** представлено построенное нами филогенетическое дерево вирусов А/Н7, из которого видно, что использованный «европейский» вирус-иммуно-

**Таблица 1. Иммунохимические и биологические свойства моноклональных антител к вирусу гриппа А/Н7N3**

**Table 1. Immunochemical and biological properties of monoclonal antibodies to influenza A/H7N3 virus**

	Моноклональные антитела Monoclonal antibodies						
	7D11	7H9	8A3	9B2	9B10	9E11	9G12
Класс и субкласс иммуноглобулина Immunoglobulin class and subclass	IgG*, IgG3	IgG, IgG2a	IgG, н.и. n.i.	IgG, IgG1	IgG, IgG1	IgG, IgG2a	IgG, н.и. n.i.
Иммуноблоттинг с вирусом A/mallard/ Netherlands/12/2000 (H7N3) (белок) Immunoblotting with A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N3) virus (protein)	HA1	HA1	HA1	HA1	HA1	HA1	HA1
Активность в непрямом ИФА с вирусом A/mallard/ Netherlands/12/2000 (H7N3), титр** Activity in indirect ELISA with virus A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N3), titer**	5 × 10 <sup>6</sup>	5 × 10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	5 × 10 <sup>7</sup>	10 <sup>4</sup>	5 × 10 <sup>6</sup>	5 × 10 <sup>6</sup>
Активность в реакции нейтрализации с вирусом A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N3), титр*** Activity in neutralization reaction with virus A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N3), titer**	> 2 × 10 <sup>3</sup>	2 × 10 <sup>3</sup>	н.и. n.i.	10 <sup>3</sup>	н.и. n.i.	н.и. n.i.	н.и. n.i.
Активность в реакции нейтрализации с вирусом A/Anhui/1/2013 (H7N9), титр*** Activity in neutralization reaction with virus A/Anhui/1/2013 (H7N9), titer***	> 2 × 10 <sup>3</sup>	2 × 10 <sup>3</sup>	н.и. n.i.	10 <sup>3</sup>	н.и. n.i.	н.и. n.i.	н.и. n.i.

**Примечание.** \*приведены данные одного из 3 типичных экспериментов; \*\*титры МКА представлены в обратных разведениях; \*\*\*нейтрализующим титром моноклональных антител считали последнее их разведение, при котором наблюдалось 2-кратное снижение оптической плотности при длине волны 450 нм (ОП<sub>450</sub>) по сравнению с контролем репродукции вируса; н.и. – не исследовались; HA1 – большая субъединица молекулы гемагглютинаина; ИФА – иммуноферментный анализ.

**Note.** \*data from one of three typical experiments are presented; \*\*monoclonal antibodies titers are presented in reverse dilutions; \*\*\*the neutralizing titer of monoclonal antibodies was considered to be the last dilution in which there was a twofold decrease in optical density at a wavelength of 450 nm (OD<sub>450</sub>) compared to the control of virus reproduction; n.i., not investigated; HA1, large subunit of hemagglutinin molecule; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay.

**Таблица 2. Активность моноклональных антител в реакции торможения гемагглютинации с различными штаммами вируса гриппа А (титры)**

**Table 2. Monoclonal antibodies activity in hemagglutination inhibition test with different influenza A virus strains (titers)**

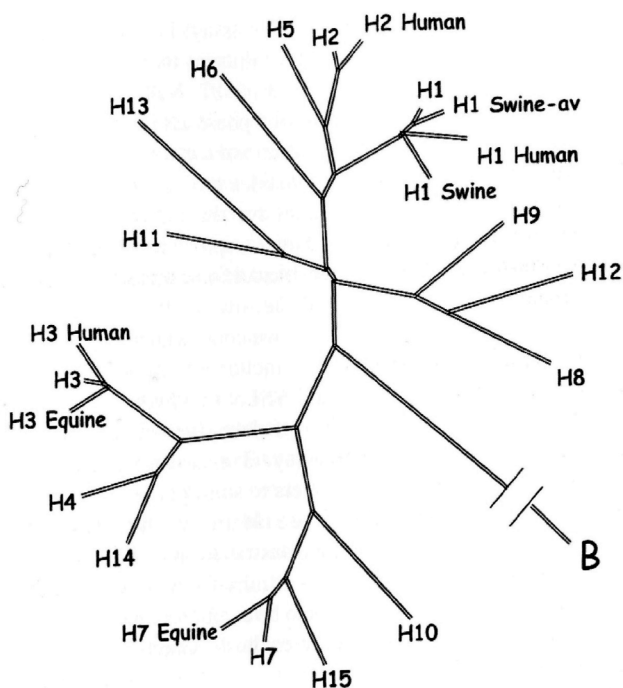
Вирусные штаммы Virus strains	Моноклональные антитела* Monoclonal antibodies*						
	7D11	7H9	8A3	9B2	9B10	9E11	9G12
A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N3)	1 : 20 480**	1 : 20 480	1 : 640 – 1 : 1280	1 : 20 480	1 : 640 – 1 : 1280	1 : 10 240	1 : 10 240
A/FPV/Rostock/34 (H7N1)	1 : 6400	< 1 : 100	< 1 : 20	< 1 : 100	< 1 : 20	< 1 : 100	1 : 400
A/FPV/Weybridge (H7N7)	1 : 200	< 1 : 100	< 1 : 20	< 1 : 100	< 1 : 20	< 1 : 100	< 1 : 100
A/Anhui/1/2013 (H7N9)	1 : 10 240	1 : 10 240	н.и. n.i.	1 : 320	н.и. n.i.	н.и. n.i.	н.и. n.i.
A/Shanghai/2/2013 (H7N9)	1 : 20 480	1 : 10 240	н.и. n.i.	1 : 640	н.и. n.i.	н.и. n.i.	н.и. n.i.
A/chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2)	1 : 800	1 : 3200	< 1 : 20	< 1 : 100	< 1 : 20	1 : 1600	1 : 3200
A/chicken/NJ/294508-12/2004 (H7N2)	1 : 3200	< 1 : 100	< 1 : 20	< 1 : 100	< 1 : 20	1 : 800	1 : 3200
A/avian/NJ/273874/2003 (H7N2)	1 : 12 800	1 : 6400	< 1 : 20	< 1 : 100	< 1 : 20	1 : 1600	1 : 3200
A/duck/Australia/341/83 (H15N8)	< 1 : 20	< 1 : 20	< 1 : 20	< 1 : 20	< 1 : 20	1 : 320	1 : 2560
A/duck/Moscow/4970/2013 (H1N1)	< 1 : 20	< 1 : 20	< 1 : 20	< 1 : 20	< 1 : 20	< 1 : 20	< 1 : 20
A/duck/Moscow/4182/2010 (H5N3)	< 1 : 20	< 1 : 20	< 1 : 20	< 1 : 20	< 1 : 20	< 1 : 20	< 1 : 20

**Примечание.** \*приведены данные одного из 3 типичных экспериментов; \*\*приведены обратные величины титра моноклональных антител в реакции торможения гемагглютинации; н.и. – не исследовались.

**Note.** \*data from one of three typical experiments are presented; \*\*the inverse values of the monoclonal antibodies titer in hemagglutination inhibition are given; n.i., not investigated.

ген A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N3) достаточно далеко расположен от «корневых» ВГ A/H7 штаммов A/FPV/Rostock/34 (H7N1), A/FPV/Weybridge (H7N7), равно как и от «азиатских», сравнительно недавних изолятов A/Anhui/1/2013 (H7N9), A/Shanghai/2/2013 (H7N9), и ещё далее – от A/chicken/NJ/294508-12/2004 (H7N2), принадлежащего «американской» ветви дерева. К сожалению, последовательность штамма A/avian/NJ/273874/2003 (H7N2) в базе данных не найдена, вероятно, в связи с тем, что она не была секвенирована.

Полные версии построенных деревьев приведены в сопроводительных материалах (<https://doi.org/10.36233/0507-4088-45supl1>, <https://doi.org/10.36233/0507-4088-45supl2>, <https://doi.org/10.36233/0507-4088-45supl3>, <https://doi.org/10.36233/0507-4088-45supl4>, <https://doi.org/10.36233/0507-4088-45supl5>, <https://doi.org/10.36233/0507-4088-45supl6>).



**Рис. 1.** Эволюционные связи между вирусами гриппа водоплавающих птиц и млекопитающих, основанные на результатах полногеномного секвенирования генов гемагглютинаина репрезентативных вирусных штаммов [17].

**Fig. 1.** Evolutionary relationships between waterfowl and mammalian influenza viruses based on the results of genome-wide gene sequencing of representative viral strains [17].

0507-4088-45supl2, <https://doi.org/10.36233/0507-4088-45supl3>, <https://doi.org/10.36233/0507-4088-45supl4>, <https://doi.org/10.36233/0507-4088-45supl5>, <https://doi.org/10.36233/0507-4088-45supl6>).

### Обсуждение

Возбудитель гриппа А с гемагглютинином подтипа Н7 может стать потенциальной причиной будущей пандемии [21]. В этой связи поиск направленных против данного патогена средств, а также компонентов диагностических тест-систем [22, 23] для быстрой идентификации и типирования новых изолятов является актуальной задачей как для ветеринарии, так и для общественного здравоохранения. С этой целью в настоящем исследовании разработана панель МКАТ к молекуле НА низкопатогенного ВГ A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N3). Ранее он был выбран в качестве донора НА для создания вируса-реассортанта – вакцинного штамма [24]. В более поздней работе предложены векторные вакцины на основе этого же штамма [25]. Отметим, что A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N3), так же как и A/mallard/Netherlands/2/2000 (H10N7), послужил прототипом высокопатогенного природного реассортанта A/chicken/Netherlands/1/2003 (H7N7), вызвавшего эпизоотию в Европе в начале XX в. Таким образом, выбор возбудителя-иммуногена для получения МКАТ был сделан не случайно.

Полученные нами антитела к «европейскому» возбудителю A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N3), как оказалось, слабо реагируют в РТГА с патогенными «азиатскими» (A/Anhui/1/2013 (H7N9) и A/Shanghai/2/2013 (H7N9)) вирусами 2013 г., ещё более слабо – с «американскими» (A/chicken/NJ/294508-12/2004 (H7N2), A/avian/NJ/273874/2003 (H7N2) и A/chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2)), а также «корневыми европейскими» (A/FPV/Rostock/34 (H7N1) и A/FPV/Weybridge (H7N7)) изолятами этого подтипа. Тем не менее некоторые МКАТ (7D11, 7H9, 9E11 и 9G12) демонстрируют высокие титры в РТГА с филогенетически удалёнными вирусами. Поэтому нам представлялось важным построить более современные филогенетические деревья с целью определения удалённости друг от друга используемых штаммов, что было сделано с помощью программ, оптимизи-

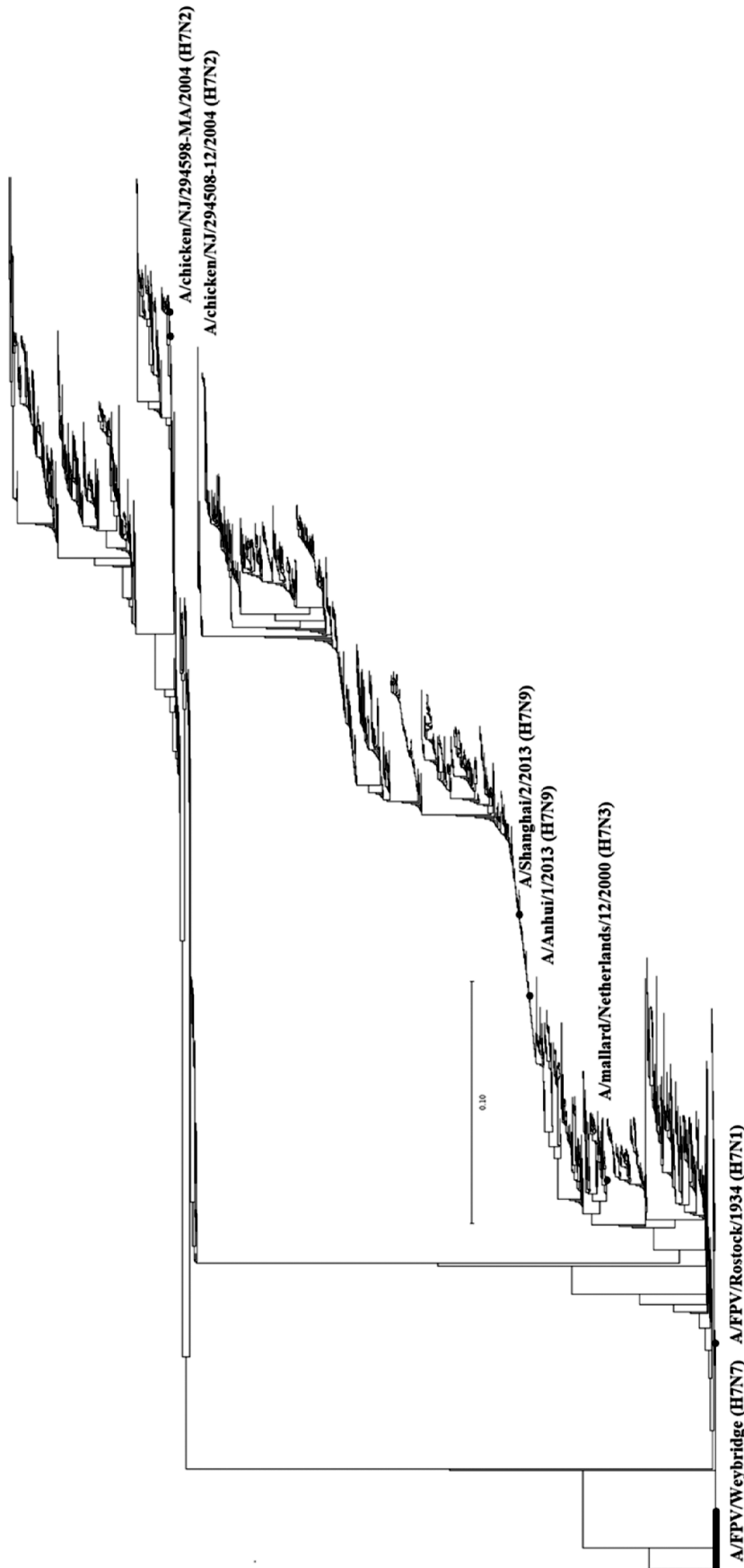
**Таблица 3.** Взвешенная дистанция Робинсона–Фулдса между филогенетическими деревьями (в процентах)

**Table 3.** The Robinson–Foulds weighted distance between phylogenetic trees (at percentage)

Методы построения филогенетических деревьев (программа и матрица замен) Methods of phylogenetic trees construction (program and substitution matrix)	FastTree-LG	RAxML-FLU	RAxML-LG
FastTree-LG	0	28,9	35,0
RAxML-FLU	28,9	0	10,3
RAxML-LG	35,0	10,3	0

**Примечание.** За расстояние между деревьями принимается сумма A + B (где A – количество разбиений первого дерева, которые не присутствуют во втором, B – аналогичное количество для второго дерева, которые не присутствуют в первом), отнесённая к общему количеству разбиений и выраженная в процентах (взвешенная дистанция Робинсона–Фулдса). В ячейках таблицы приведены различия в процентах между деревьями, построенными при помощи разных программ.

**Note.** The distance between the trees is taken as the sum of A + B (where A is the number of partitions of the first tree that are not present in the second, B is the number of partitions of the second tree that are not present in the first) assigned to the total number of partitions and expressed in percent (Robinson–Foulds weighted distance). The table cells show the percentage differences between trees constructed using different programs.



**Рис. 2.** Филогенетическое дерево гемагглютинаина H7, построенное программой RAxML с матрицей замен FLU.

**Примечание.** Шкала характеризует дату сбора штаммов (от 1902 до 2020 г.).

**Fig. 2.** The phylogenetic tree for H7 hemagglutinin constructed by the RAxML program with the FLU substitution matrix.

**Note.** The scale characterizes the date of collection of strains (from 1902 to 2020).

рованных к увеличению количества последовательностей. Результат оказался аналогичным «старым» версиям филогении [19], в которых вирусы гриппа А/Н7 подразделяются на 4 основные ветви: «австралийскую», «евразийскую», «лошадиную» и «американскую», причём последняя является наиболее удалённой от остальных. Такое распределение связано, по-видимому, с преимущественно меридианно-направленной миграцией диких птиц – переносчиков птичьего гриппа [26].

К сожалению, МКАТ 9Е11 и 9G12, обнаружившие связывание в РТГА с вирусом Н15 (эволюционно близким к Н7), нельзя использовать для дифференциальной диагностики и типирования НА в иммунологических тестах. В дальнейшем планируется исследовать их реактогенную способность по отношению к более развёрнутому спектру возбудителей гриппа с различными подтипами НА.

### Заключение

Достаточно высокая вируснейтрализующая активность антител 7D11, 7H9 и 9B2 предполагает возможность их перспективного применения в качестве реагентов диагностических тест-систем, профилактических и лечебных средств.

Все МКАТ панели, представленной в данной работе, в дальнейшем планируется использовать для изучения особенностей тонкой антигенной структуры молекулы Н7. Кроме того, полученные нами антитела могут найти применение не только для эпитопного картирования НА Н7 (которое к настоящему времени, к сожалению, недостаточно разработано) и в качестве реагентов тест-систем, но и для определения общих («универсальных») эпитопов в молекуле НА подтипа Н7 разных штаммов.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Львов Д.К., ред. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. М.: МИА; 2013.
2. Elbers A.R., Fabri T.H., de Vries T.S., de Wit J.J., Pijpers A., Koch G. The highly pathogenic avian influenza A (H7N7) virus epidemic in the Netherlands in 2003 – lessons learned from the first five outbreaks. *Avian Dis.* 2004; 48(3): 691–705. <https://doi.org/10.1637/7149>
3. Kemink S.A., Fouchier R.A., Rozendaal F.W., Broekman J.M., Koopmans M., Osterhaus A.D., et al. A fatal infection due to avian influenza-A (H7N7) virus and adjustment of the preventive measures. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 2004; 148(44): 2190–4.
4. WHO. Overview of the emergence and characteristics of the avian influenza A(H7N9) virus. Available at: [http://www.who.int/influenza/human\\_animal-interface/influenza-h7n9/WHO\\_H7N9\\_review\\_31May13.pdf](http://www.who.int/influenza/human_animal-interface/influenza-h7n9/WHO_H7N9_review_31May13.pdf) (accessed May 14, 2021).
5. Schmeiser F., Vasudevan A., Verma S., Wang W., Alvarad E., Weiss C., et al. Antibodies to antigenic site A of influenza H7 hemagglutinin provide protection against H7N9 challenge. *PLoS One.* 2015; 10(1): e0117108. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117108>
6. Thornburg N.J., Zhang H., Bangaru S., Sapparapu G., Kose N., Lampley R.M., et al. H7N9 influenza virus neutralizing antibodies that possess few somatic mutations. *J. Clin. Invest.* 2016; 126(4): 1482–94. <https://doi.org/10.1172/jci85317>
7. Yao L., Chen Y., Wang X., Bi Z., Xiao Q., Lei J., et al. Identification of antigenic epitopes in the haemagglutinin of H7 avian influenza virus. *Avian. Pathol.* 2020; 49(1): 62–73. <https://doi.org/10.1080/03079457.2019.1666971>
8. Седова Е.С., Верховская Л.В., Артёмова Э.А., Щербинин Д.Н., Лысенко А.А., Руднева И.А., и др. Защита мышей от заражения вирусом гриппа птиц субтипа Н7 с помощью иммунизации рекомбинантным аденовирусом, кодирующим консерва-

- тивных антигены вируса гриппа А. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2020; 20(1): 60–7. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-1-60-67>
9. Суховецкая В.Ф., Дондурей Е.А., Дриневский В.П., Соминина А.А., Майорова В.Г., Писарева М.М., и др. Методические рекомендации. Выделение вирусов гриппа в клеточных культурах и куриных эмбрионах и их идентификация. Санкт-Петербург; 2006.
10. Сорокин Е.В., Царёва Т.Р., Желтухина А.И. Моноклональные антитела к геммагглютинуину вирусов гриппа В викторианской эволюционной линии. *Вопросы вирусологии.* 2018; 63(6): 275–80. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-6-275-280>
11. Price M.N., Dehal P.S., Arkin A.P. FastTree 2-approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One.* 2010; 5(3): e9490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>
12. Le S.Q., Gascuel O. An improved general amino acid replacement matrix. *Mol. Biol. Evol.* 2008; 25(7): 1307–20. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn067>
13. Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics.* 2014; 30(9): 1312–3. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
14. Dang C.C., Le Q.S., Gascuel O., Le V.S. FLU, an amino acid substitution model for influenza proteins. *BMC Evol. Biol.* 2010; 10: 99. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-99>
15. Куш А.А., Климова Р.Р., Масалова О.В., Фёдорова Н.Е., Ботиков А.Г., Федякина И.Т., и др. Получение и свойства моноклональных антител к высокопатогенному штамму вируса гриппа птиц А(Н5N1), выделенного на территории Российской Федерации. *Вопросы вирусологии.* 2008; 53(5): 9–14.
16. Климова Р.Р., Масалова О.В., Бурцева Е.И., Чичев Е.В., Леснова Е.И., Оскерко Т.А., и др. Моноклональные антитела к пандемическому вирусу гриппа А/IV-Moscow/01/2009 (H1N1)swl, обладающие высокой вируснейтрализующей активностью. *Вопросы вирусологии.* 2011; 56(3): 15–20.
17. Matrosovich M.N., Klenk H.-D., Kawaoka Y. Receptor specificity, host-range, and pathogenicity of influenza viruses. In: Kawaoka Y., ed. *Influenza Virology: Current Topics.* Wymondham, UK: Caister Academic Press; 2006: 95–138.
18. Sievers F., Wilm A., Dineen D.G., Gibson T.J., Karplus K., Li W., et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 2011; 7: 539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
19. Banks J., Speidel E.C., McCauley J.W., Alexander D.J. Phylogenetic analysis of H7 haemagglutinin subtype influenza A viruses. *Arch. Virol.* 2000; 145(5): 1047–58. <https://doi.org/10.1007/s007050050695>
20. Robinson D.F., Foulds L.R. Comparison of phylogenetic trees. *Math. Biosci.* 1981; 53(1): 131–47. [https://doi.org/10.1016/0025-5564\(81\)90043-2](https://doi.org/10.1016/0025-5564(81)90043-2)
21. Webster R.G., Govorkova E.A. Continuing challenges in influenza. *Ann. NY Acad. Sci.* 2014; 1323(1): 115–39. <https://doi.org/10.1111/nyas.12462>
22. Chen L., Ruan F., Sun J., Chen H., Liu M., Zhou J., et al. Establishment of sandwich ELISA for detecting the H7 subtype influenza A virus. *J. Med. Virol.* 2019; 91(6): 1168–71. <https://doi.org/10.1002/jmv.25408>
23. Dong J., Fan J., Wang J., Zhang Q., Wang Y., Jia Y., et al. Development and evaluation of a C-ELISA for rapid detection of antibody to AIV-H7. *Anal. Biochem.* 2019; 572: 52–7. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.02.024>
24. Jadhao S.J., Achenbach J., Swayne D.E., Donis R., Cox N., Matsuoka Y. Development of Eurasian H7N7/PR8 high growth reassortant virus for clinical evaluation as an inactivated pandemic influenza vaccine. *Vaccine.* 2008; 26(14): 742–50. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.01.036>
25. Meseda C.A., Atukorale V., Soto J., Eichelberger M.C., Gao J., Wang W., et al. Immunogenicity and protection against influenza H7N3 in mice by modified vaccinia virus Ankara vectors expressing influenza virus hemagglutinin or neuraminidase. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 5364. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23712-9>
26. Боголюбов А.С., Жданова О.В., Кравченко М.В. Справочник по орнитологии. Миграции птиц. М.: Экосистема; 2006.

### REFERENCES

1. Lvov D.K., ed. *Viruses and Viral Infections of Humans and Animals [Virusy i virusnye infektsii cheloveka i zhivotnykh]*. Moscow: MIA; 2013. (in Russian)



2. Elbers A.R., Fabri T.H., de Vries T.S., de Wit J.J., Pijpers A., Koch G. The highly pathogenic avian influenza A (H7N7) virus epidemic in the Netherlands in 2003 – lessons learned from the first five outbreaks. *Avian Dis.* 2004; 48(3): 691–705. <https://doi.org/10.1637/7149>
3. Kemink S.A., Fouchier R.A., Rozendaal F.W., Broekman J.M., Koopmans M., Osterhaus A.D., et al. A fatal infection due to avian influenza-A (H7N7) virus and adjustment of the preventive measures. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 2004; 148(44): 2190–4.
4. WHO. Overview of the emergence and characteristics of the avian influenza A(H7N9) virus. Available at: [http://www.who.int/influenza/human\\_animal-interface/influenza-h7n9/WHO\\_H7N9\\_review\\_31May13.pdf](http://www.who.int/influenza/human_animal-interface/influenza-h7n9/WHO_H7N9_review_31May13.pdf) (accessed May 14, 2021).
5. Schmeiser F., Vasudevan A., Verma S., Wang W., Alvarad E., Weiss C., et al. Antibodies to antigenic site A of influenza H7 haemagglutinin provide protection against H7N9 challenge. *PLoS One.* 2015; 10(1): e0117108. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117108>
6. Thornburg N.J., Zhang H., Bangaru S., Sapparapu G., Kose N., Lampley R.M., et al. H7N9 influenza virus neutralizing antibodies that possess few somatic mutations. *J. Clin. Invest.* 2016; 126(4): 1482–94. <https://doi.org/10.1172/jci85317>
7. Yao L., Chen Y., Wang X., Bi Z., Xiao Q., Lei J., et al. Identification of antigenic epitopes in the haemagglutinin of H7 avian influenza virus. *Avian. Pathol.* 2020; 49(1): 62–73. <https://doi.org/10.1080/0379457.2019.1666971>
8. Sedova E.S., Verkhovskaya L.V., Artemova E.A., Shcherbinin D.N., Lysenko A.A., Rudneva I.A., et al. Protecting mice from H7 avian influenza virus by immunisation with a recombinant adenovirus encoding influenza A virus conserved antigens [*Zashchita myshey ot zarazheniya virusom grippa ptits subtipa N7 s pomoshchyu immunizatsii rekombinantnym adenovirusom, kodiruyushchim konservativnye antigeny virusa grippa A. BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie*]. 2020; 20(1): 60–7. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-1-60-67> (in Russian)
9. Sukhovetskaya V.F., Dondurey E.A., Drinevskiy V.P., Somnina A.A., Mayorova V.G., Pisareva M.M., et al. Methodological recommendations. Isolation of influenza viruses in cell cultures and chicken embryos and their identification [*Metodicheskie rekomendatsii. Vydelenie virusov grippa v kletochnykh kulturakh i kurinykh embrionakh i ikh identifikatsiya*]. St. Petersburg; 2006. (in Russian)
10. Sorokin E.V., Tsareva T.R., Zheltukhina A.I. Monoclonal antibodies to hemagglutinin of influenza B viruses Victoria evolutionary lineage [*Monoklonal'nye antitela k gemagglutininu virusov grippa B viktori-anskoj evolyutsionnoy linii*]. *Voprosy virusologii.* 2018; 63(6): 275–80. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-6-275-280> (in Russian)
11. Price M.N., Dehal P.S., Arkin A.P. FastTree 2-approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One.* 2010; 5(3): e9490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>
12. Le S.Q., Gascuel O. An improved general amino acid replacement matrix. *Mol. Biol. Evol.* 2008; 25(7): 1307–20. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn067>
13. Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics.* 2014; 30(9): 1312–3. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
14. Dang C.C., Le Q.S., Gascuel O., Le V.S. FLU, an amino acid substitution model for influenza proteins. *BMC Evol. Biol.* 2010; 10: 99. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-99>
15. Kushch A.A., Klimova R.R., Masalova O.V., Fedorova N.E., Botikov A.G., Fedyakina I.T., et al. Monoclonal antibodies to highly pathogenic avian influenza A(H5N1) strain isolated in the Russian Federation: development and properties [*Poluchenie i svoystva monoklonal'nykh antitel k vysokopatogennomu shtammu virusa grippa ptits A(H5N1), vydelennogo na territorii Rossiyskoy Federatsii*]. *Voprosy virusologii.* 2008; 53(5): 9–14. (in Russian)
16. Klimova R.R., Masalova O.V., Burtseva E.I., Chichev E.V., Lesnova E.I., Oskerko T.A., et al. Monoclonal antibodies with high virus-neutralizing activity against pandemic influenza virus A/IIV-Moscow/01/2009 (H1N1)swl [*Monoklonal'nye antitela k pandemicheskomu virusu grippa A/IIV-Moscow/01/2009 (H1N1)swl, obladayushchie vysokoy virusneytralizuyushchey aktivnost'yu*]. *Voprosy virusologii.* 2011; 56(3): 15–2. (in Russian)
17. Matrosovich M.N., Klenk H.-D., Kawaoka Y. Receptor specificity, host-range, and pathogenicity of influenza viruses. In: Kawaoka Y., ed. *Influenza Virology: Current Topics*. Wymondham, UK: Caister Academic Press. 2006; 95–138.
18. Sievers F., Wilm A., Dineen D.G., Gibson T.J., Karplus K., Li W., et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 2011; 7: 539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
19. Banks J., Speidel E.C., McCauley J.W., Alexander D.J. Phylogenetic analysis of H7 haemagglutinin subtype influenza A viruses. *Arch. Virol.* 2000; 145(5): 1047–58. <https://doi.org/10.1007/s007050050695>
20. Robinson D.F., Foulds L.R. Comparison of phylogenetic trees. *Math. Biosci.* 1981; 53(1): 131–47. [https://doi.org/10.1016/0025-5564\(81\)90043-2](https://doi.org/10.1016/0025-5564(81)90043-2)
21. Webster R.G., Govorkova E.A. Continuing challenges in influenza. *Ann. NY Acad. Sci.* 2014; 1323(1): 115–39. <https://doi.org/10.1111/nyas.12462>
22. Chen L., Ruan F., Sun J., Chen H., Liu M., Zhou J., et al. Establishment of sandwich ELISA for detecting the H7 subtype influenza A virus. *J. Med. Virol.* 2019; 91(6): 1168–71. <https://doi.org/10.1002/jmv.25408>
23. Dong J., Fan J., Wang J., Zhang Q., Yang Y., Jia Y., et al. Development and evaluation of a C-ELISA for rapid detection of antibody to AIV-H7. *Anal. Biochem.* 2019; 572: 52–7. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.02.024>
24. Jadhao S.J., Achenbach J., Swayne D.E., Donis R., Cox N., Matsuo-ka Y. Development of Eurasian H7N7/PR8 high growth reassortant virus for clinical evaluation as an inactivated pandemic influenza vaccine. *Vaccine.* 2008; 26(14): 742–50. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.01.036>
25. Meseda C.A., Atukorale V., Soto J., Eichelberger M.C., Gao J., Wang W., et al. Immunogenicity and protection against influenza H7N3 in mice by modified vaccinia virus Ankara vectors expressing influenza virus hemagglutinin or neuraminidase. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 5364. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23712-9>
26. Bogolyubov A.S., Zhdanova O.V., Kravchenko M.V. Handbook of Ornithology. Migrations of Birds [*Spravochnik po ornitologii. Migratsii ptits*]. Moscow: Ecosystem; 2006. (in Russian)