

*А. И. Драпеза, Г. А. Скороход, Е. И. Гудкова,
В. А. Лобан, Н. В. Плешко*

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПАРАМЕТРОВ
ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫХ ТЕРМОГРАММ
ПОПУЛЯЦИЙ *E. COLI*, *S. AUREUS*,
P. AERUGINOSA, *C. ALBICANS* С ПОЗИЦИИ
УСКОРЕННОГО ИХ ОБНАРУЖЕНИЯ
И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ**

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

*Сравнительный анализ параметров дифференциальных термограмм интактных популяций *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* и *C. albicans*, полученных в питательных средах ТСБ и пятипроцентный раствор глюкозы, показывает, что данные популяции возможно статистически достоверно обнаружить и дифференцировать по выборочной совокупности значений термограмм в течение 3400 секунд по экзотермическому и эндотермическому характеру поведения.*

Из полученных нами последних результатов следует, что для ускоренного обнаружения и дифференциации вида интактных микроорганизмов оптимальным условием является использование пятипроцентного раствора глюкозы при температуре 37 °С, при котором достигается высокая вероятность достоверного обнаружения и дифференциации всех видов исследуемых в данной работе популяций.

Ключевые слова: *дифференциальные термограммы; популяции *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*; обнаружение и дифференция видов; ТСБ; 5 % раствор глюкозы.*

□ Оригинальные научные публикации

*A. I. Drapeza, G. A. Chkorohod, E. I. Gudkova,
V. A. Loban, N. V. Pleshko*

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE PARAMETERS OF DIFFERENT TYPES DIFFERENTIAL THERMOGRAM MICROORGANISMS *E. COLI*, *S. AUREUS*, *P. AERUGINOSA* AND *C. ALBICANS* FROM THE POSITION OF ACCELERATED THEIR DETECTION AND DIFFERENTIATION

*Comparative analysis of parameters differential thermograms of the intact populations *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *C. albicans* received in nutrients medium shows that theirs possible statistically significantly to detect and to differentiate their species of selection thermogram values within 3400 seconds for endothermic and exothermic of the behavior pattern.*

From received findings of investigation is evident, that for accelerated of detection and differentiation of intact form microorganisms optimum alternative is to use a 5 % glucose solution at 37 °C, which achieves a high probability of reliable detection and differentiation of all species studied in given work of the populations.

Key words: *differential thermograms; microorganisms *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*; detection and differentiation of species; TSB; 5 % glucose solution.*

Для ускоренного обнаружения и идентификации микроорганизмов используют, как правило, такие высокотехнологичные методы, как секвенирование гена 16S рибосомальной РНК и определение спектра белков с помощью масс-спектрометрии [1–3].

В последние годы в зарубежной литературе появились отдельные публикации, в которых для решения указанных задач исследуются возможности применения метода изотермической микрокалориметрии. Преимущество данного метода состоит в возможности прямого обнаружения и дифференциации жизнеспособных микроорганизмов, в том числе и при оценке эффективности противомикробных средств [4, 5], что связано с высокой чувствительностью современных изотермических микрокалориметров, обеспечивающих предел обнаружения теплопродукции на уровне единиц мкВт [6, 7].

В настоящей работе представлены результаты исследований по сравнительному анализу параметров различных типов дифференциальных термограмм популяций *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* и *C. albicans* с позиции их ускоренного обнаружения и дифференциации.

Материалы и методы

Для проведения исследования использовали суспензии интактных популяций эталонных штаммов бактерий *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* и грибов *C. albicans*, а также фильтраты этих суспензий, стандартную питательную среду – триптиказо-соевый бульон (ТСБ) и 5 % раствор глюкозы.

Суспензии популяций готовили смывом физиологическим раствором или 5 % раствором глюкозы 24-х часовых культур, выращенных на скошенном мясо-пептонном агаре. Количество микроорганизмов в суспензиях доводили до концентрации 1×10^9 КОЕ/мл путем измерений на фотометре серии РВ2201 (Солар ЛС, РБ) по методу МакФарланда, с последующим разведением этими же субстратами до 1×10^4 КОЕ/мл.

Фильтраты получали фильтрованием суспензий (1×10^9 КОЕ/мл) через микропористый фильтр (диаметр пор 200 нм) фирмы Corning (Германия). Полученный фильтрат разводили до степени разведения суспензии популяций интактных микроорганизмов (1×10^4 КОЕ/мл).

Измерение теплопродукции популяций микроорганизмов в ТСБ и 5 % растворе глюкозы проводили на лабораторном макете измерительно-информационной системы (ИИС) при температурах 30 °C и 37 °C. Точность измерения изменений температуры в измерительных ячейках не превышала 0,0008 °C. Мощность рассеяния на единицу площади по результатам калибровки составляла $1,44 \times 10^{-7}$ Вт [8].

Дифференциальные измерения теплопродукции обеспечивались использованием двух ячеек, одна из которых являлась опытной, другая – референтной.

Для получения искомых результатов выполняли два типа измерений:

1-ый тип: В опытную и референтную ячейки вносили по 300 мкл ТСБ или 5 % раствора глюкозы с последующим добавлением 100 мкл фильтрата (Ф). Данное измерение позволяло учесть

изменение уровня базовой линии дифференциальной температуры в зависимости от изменения теплового режима, обусловленного процессами биохимических реакций в средах обеих ячеек, в отсутствие микробных клеток.

2-ой тип: Заполнение референтной ячейки проводили аналогично предыдущему типу, а в опытную ячейку добавляли 300 мкл ТСБ или 5 % раствора глюкозы + 100 мкл суспензии интактных микроорганизмов в концентрации 1×10^4 КОЕ/мл. Данный тип измерений позволил учесть изменения теплопродукции в опытной ячейке, вызванные интактной популяцией.

Генеральную совокупность значений дифференциальных термограмм исследуемых культур получали при ежесекундном измерении в течение 3400 секунд. Для проведения сравнительного анализа термограмм использовали выборочные совокупности их значений, полученные за период 2400–3400 секунд, с последующей статистической обработкой с использованием программы Excel 2007 для количества точек $n = 1000$ и надежности безошибочного прогноза $\alpha = 95\%$.

Результаты и обсуждение

На рисунке, на примере *S. albicans* (ТСБ, 37 °С), приведены виды дифференциальных термограмм при 1-ом и 2-ом типах измерений, полученные и сглаженные, для наглядности, по 20-ти точкам с помощью программы Excel 2007, используя функцию «линейная фильтрация».

Таблица 1. Пример результатов обработки различных типов дифференциальных термограмм популяций микроорганизмов *S. albicans* в среде ТСБ при 37 °С

Исследуемые параметры	Термограммы (1-ый тип) $\bar{T} \pm \Delta T, ^\circ\text{C}$	Термограммы (2-ой тип) $\bar{T} \pm \Delta T, ^\circ\text{C}$
Эксперимент 1 ($n = 1000, \alpha = 95\%$)	$0,8865 \pm 0,0001$	$0,8779 \pm 0,0004$
Эксперимент 2 ($n = 1000, \alpha = 95\%$)	$0,8823 \pm 0,0002$	$0,8705 \pm 0,0003$
Эксперимент 3 ($n = 1000, \alpha = 95\%$)	$0,8854 \pm 0,0005$	$0,8763 \pm 0,0005$
Усредненные результаты ($n = 3, \alpha = 90\%$)	$0,8847 \pm 0,0008$	$0,8749 \pm 0,0012$

кретного вида популяции и была характерна как для предыдущих исследований [9], выполненных нами ранее, так и для данного эксперимента.

Установленное условие репрезентативности является предпосылкой для возможности безошибочного ускоренного обнаружения и дифференциации различных видов микроорганизмов по характеру метаболизма и величинам отклонения разностных значений усредненных термограмм.

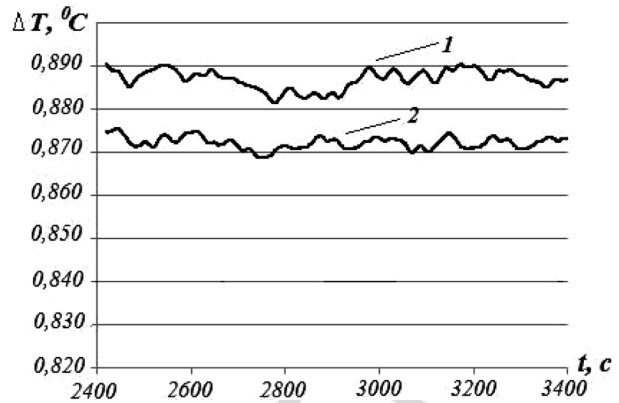


Рисунок. Дифференциальные термограммы 1-го, 2-го типа микроорганизма *S. albicans* в среде ТСБ при 37 °С

При статистической обработке однотипных термограмм, полученных в различное время, проводили их усреднение для количества экспериментов ($n = 3$) и надежности ($\alpha = 90\%$), что, в качестве примера, показано в табл. 1.

Абсолютную ошибку при математических операциях усреднения полученных статистических результатов однотипных термограмм 1-го и 2-го типа получали путем суммирования ошибок их доверительных интервалов, что видно из табл. 1.

Условием репрезентативности выборочной совокупности, полученной путем усреднения ($n = 3, \alpha = 90\%$) значений однотипных термограмм, являлось то, что динамика их поведения от эксперимента к эксперименту, которые проводились в различные дни, сохранялась для кон-

Для проведения сравнительного анализа результаты усредненных значений дифференциальных термограмм, полученных для популяции различных микроорганизмов (пример табл. 1), представлены в табл. 2.

Обработка параметров термограмм

Дальнейшая обработка результатов параметров дифференциальных термограмм 1-го и 2-го типа, в зависимости от вида среды и значения температуры, выполнена на основании

Оригинальные научные публикации

Таблица 2. Усредненные значения параметров термограмм 1-го и 2-го типа популяций *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* и *C. albicans* в зависимости от типа среды и температуры

Условия измерения		$\bar{T} \pm \Delta T$ °C (n = 3, $\alpha = 90$ %)		
среда		температура среды T °C	термограмма (1-ый тип)	термограмма (2-ой тип)
ТСБ	<i>E. coli</i>	30	0,879 ± 0,001	0,895 ± 0,001
		37	0,895 ± 0,001	0,864 ± 0,001
5 % глюкоза		30	0,827 ± 0,001	0,821 ± 0,001
		37	0,836 ± 0,001	0,866 ± 0,001
ТСБ	<i>S. aureus</i>	30	0,821 ± 0,001	0,843 ± 0,001
		37	0,879 ± 0,001	0,894 ± 0,001
5 % глюкоза		30	0,838 ± 0,001	0,815 ± 0,001
		37	0,879 ± 0,001	0,894 ± 0,001
ТСБ	<i>P. aeruginosa</i>	30	0,897 ± 0,001	0,886 ± 0,001
		37	0,933 ± 0,001	0,942 ± 0,001
5 % глюкоза		30	0,911 ± 0,001	0,903 ± 0,001
		37	0,929 ± 0,001	0,973 ± 0,001
ТСБ	<i>C. albicans</i>	30	0,886 ± 0,001	0,878 ± 0,001
		37	0,885 ± 0,001	0,875 ± 0,001
5 % глюкоза		30	0,800 ± 0,001	0,821 ± 0,001
		37	0,878 ± 0,001	0,871 ± 0,001

Таблица 3. Разностные значения усредненных термограмм популяций различных микроорганизмов в зависимости от вида и температуры среды

Популяция	Разностные значения усредненных термограмм, °C			
	ТСБ		5 % раствор глюкозы	
	30 °C	37 °C	30 °C	37 °C
<i>E. coli</i>	0,016 ± 0,002	-0,031 ± 0,002	-0,006 ± 0,002	0,030 ± 0,002
<i>S. aureus</i>	0,022 ± 0,002	0,015 ± 0,002	-0,023 ± 0,002	0,015 ± 0,002
<i>P. aeruginosa</i>	-0,011 ± 0,002	0,009 ± 0,002	-0,008 ± 0,002	0,044 ± 0,002
<i>C. albicans</i>	0,008 ± 0,002	-0,010 ± 0,002	0,021 ± 0,002	-0,007 ± 0,002

табл. 2 путем вычитания усредненных параметров термограмм 2-го типа из аналогичных значений параметров термограмм 1-го типа, и представлена в табл. 3.

Сравнительный анализ разностных усредненных значений параметров термограмм, представленных в табл. 3, показал, что популяции *E. coli*, *S. aureus* и *C. albicans* имеют в среде ТСБ при температуре 30 °C однотипную экзотермическую направленность метаболизма. При тех же условиях интактные микроорганизмы *P. aeruginosa* проявляют эндотермический характер метаболизма.

Из табл. 3 также следует, что популяции *P. aeruginosa*, *E. coli* и *C. albicans* в среде ТСБ при 37 °C изменяют характер метаболизма относительно 30 °C на противоположный, характер метаболизма микроорганизмов *S. aureus* остается прежним.

В 5 % растворе глюкозы при 30 °C популяции *E. coli*, *S. aureus* и *P. aeruginosa* проявляют эндотер-

мический характер метаболизма, а *C. albicans* – экзотермический. При этом у популяции всех видов в этой же среде при 37 °C характер метаболизма изменяется на противоположный относительно температуры 30 °C.

Оценка достоверности дифференциации популяций микроорганизмов

Для оценки достоверности различия полученных усредненных значений дифференциальных температур, приведенных в табл. 3 для различных условий и типов микроорганизмов, воспользуемся следующим критерием [10]:

$$t = \frac{|\bar{T}_1 - \bar{T}_2|}{\sqrt{\Delta T_1^2 + \Delta T_2^2}},$$

где t – критерий достоверности различия; \bar{T}_1 , \bar{T}_2 – усредненные значения температуры дифференциальных термограмм для различных микроорганизмов; ΔT_1 , ΔT_2 – ошибки измерения

(доверительные интервалы) усредненных температур соответственно.

Поскольку величины доверительных интервалов ΔT_1 и ΔT_2 получены нами для количества измерений $n = 3$ и надежности безошибочного прогноза $\alpha = 90\%$, то для данных величин, используя таблицу критических значений коэффициента Стьюдента (t-критерия), находим значение критериального доверительного коэффициента, которое равно $t \approx 2,4$.

Если $t \geq 2,4$, то различие следует считать достоверным, что обуславливает правильность выбранного принципа измерений и соответствует надежности безошибочного прогноза для $\alpha \geq 90\%$ ($P \leq 0,1$).

При $t < 2,4$ надежность безошибочного прогноза $\alpha < 90\%$ ($P > 0,1$). Это означает, что различие усредненных значений температуры термограмм для исследуемых типов микроорганизмов недостоверно.

Результаты обработки данных табл. 3 по вышеуказанному критерию приведены в табл. 4.

В табл. 4, ниже нулевой строчки, приведены значения критериального параметра t . Выше нулевой строчки приведены вероятностные условия различия исследуемых средних значений, которые им соответствуют. При необходимости

точные значения указанных вероятностей могут быть получены с использованием таблицы критических значений коэффициента Стьюдента (t-критерия) по критериальным значениям, которые приведены в табл. 4 ниже нулевой строчки.

Для оценки вероятностных условий различия в табл. 4 приняты следующие обозначения. Для доверительной вероятности $P < 0,1$, имеющей один символ меньше, означает, что значение такой вероятности отличается от единицы на величину порядка $0,0X$, а для $P \ll 0,1$ с двумя символами меньше, – на величину порядка $0,00X$, где X – некоторое десятичное число, которое получают из таблицы Стьюдента по рассчитанным значениям параметра t , приведенным в табл. 4.

Анализ результатов табл.4 показывает, что при $30\text{ }^\circ\text{C}$ в среде ТСБ интактные пары микроорганизмов (*E. coli* – *C. albicans*, *S. aureus* – *C. albicans*) достоверно дифференцируются с величиной вероятности, имеющей отличие от единицы во втором знаке после запятой, т. е. $0,0X$. Однако, при этом дифференциация пары микроорганизмов (*E. coli* – *S. aureus*) между собой недостоверна, поскольку расчетное критериальное значение равно $2,1$, которое меньше значения критериального доверительного коэффи-

Таблица 4. Результаты вычислений значений критерия t и оценки доверительной вероятности P для различных популяции микроорганизмов в зависимости от вида и температуры среды

Значения критериального параметра t и доверительной вероятности P				
Микроорганизмы	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
30 °C, ТСБ				
<i>E. coli</i>	0	$P > 0,1$	$P \ll 0,1$	$P < 0,1$
<i>S. aureus</i>	2,1	0	$P \ll 0,1$	$P < 0,1$
<i>P. aeruginosa</i>	9,6	11,7	0	$P \ll 0,1$
<i>C. albicans</i>	4,0	5,0	6,7	0
37 °C, ТСБ				
<i>E. coli</i>	0	$P \ll 0,1$	$P \ll 0,1$	$P \ll 0,1$
<i>S. aureus</i>	16,3	0	$P > 0,1$	$P \ll 0,1$
<i>P. aeruginosa</i>	14,2	2,1	0	$P \ll 0,1$
<i>C. albicans</i>	7,4	8,9	6,7	0
30 °C, 5 % раствор глюкозы				
<i>E. coli</i>	0	$P < 0,1$	$P > 0,1$	$P \ll 0,1$
<i>S. aureus</i>	6,0	0	$P < 0,1$	$P \ll 0,1$
<i>P. aeruginosa</i>	0,3	5,3	0	$P \ll 0,1$
<i>C. albicans</i>	9,6	15,6	10,3	0
37 °C, 5 % раствор глюкозы				
<i>E. coli</i>	0	$P < 0,1$	$P < 0,1$	$P \ll 0,1$
<i>S. aureus</i>	5,3	0	$P \ll 0,1$	$P \ll 0,1$
<i>P. aeruginosa</i>	5,0	8,9	0	$P \ll 0,1$
<i>C. albicans</i>	13,1	7,8	17,7	0

□ Оригинальные научные публикации

циента 2,4. Усредненные значения температуры термограмм интактных пар микроорганизмов (*E. coli* – *P. aeruginosa*, *S. aureus* – *P. aeruginosa*, *P. aeruginosa* – *C. albicans*) достоверно различаются с величиной вероятности, отличие от единицы которой лежит в третьем знаке после запятой (0,00X).

При температуре 37 °С в среде ТСБ безошибочная вероятность достоверности различия ($P \ll 0,1$) между парами интактных микроорганизмов (*E. coli* – *S. aureus*, *P. aeruginosa* – *E. coli*, *E. coli* – *C. albicans*, *P. aeruginosa* – *C. albicans*, *S. aureus* – *C. albicans*) близка к единице на величину порядка 0,00X. Для пары микроорганизмов (*S. aureus* – *P. aeruginosa*) различие по тепловому признаку недостоверно ($P > 0,1$).

Из табл. 4 видно, что в 5 % растворе глюкозы при температуре 30 °С три интактные пары микроорганизмов (*E. coli* – *C. albicans*, *S. aureus* – *C. albicans*, *P. aeruginosa* – *C. albicans*) имеют достоверные различия между собой с вероятностью близкой к единице ($P \ll 0,1$) на величину порядка 0,00X, две пары (*E. coli* – *S. aureus*, *S. aureus* – *P. aeruginosa*) – с вероятностью близкой к единице ($P < 0,1$) на величину порядка 0,0X. Различия между парой микроорганизмов (*E. coli* – *P. aeruginosa*) недостоверно ($P > 0,1$).

В этой же среде при 37 °С (см. табл. 4) все шесть пар интактных популяций микроорганизмов (*E. coli* – *S. aureus*, *P. aeruginosa* – *E. coli*, *E. coli* – *C. albicans*, *P. aeruginosa* – *C. albicans*, *S. aureus* – *C. albicans*, *S. aureus* – *P. aeruginosa*) имеют вероятность достоверного различия близкую к единице. Однако для двух пар (*E. coli* – *S. aureus*, *P. aeruginosa* – *E. coli*) этот уровень значения вероятности $P < 0,1$, а для четырех пар (*E. coli* – *C. albicans*, *P. aeruginosa* – *C. albicans*, *S. aureus* – *C. albicans*, *S. aureus* – *P. aeruginosa*) соответственно $P \ll 0,1$.

Установленное различие подтверждает наше предположение о том, что выборочная совокупность методически репрезентативна для обработки исходных генеральных совокупностей при их использовании в целях обнаружения и дифференциации вида популяций микроорганизмов *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* и *C. albicans* по тепловому признаку.

Наблюдаемое в табл. 4 незначительное число недостоверных различий при исследуемых температурах и средах, скорее всего, может быть обусловлено случайными методическими погрешностями при выполнении экспериментов, связанными с перемешиванием для обеспечения гомогенности используемых растворов

или недостаточной точностью производимых разведений.

Таким образом, сравнительный анализ параметров дифференциальных термограмм интактных микроорганизмов *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* и *C. albicans* показывает, что данные микроорганизмы удается статистически достоверно обнаружить по выборочной совокупности в течение 3400 секунд по экзотермическому и эндотермическому характеру поведения термограмм 2-го типа относительно термограмм 1-го типа.

Из полученных результатов исследования следует, что для целей ускоренного обнаружения и дифференциации вида интактных микроорганизмов оптимальным вариантом является использование 5 % раствора глюкозы в качестве минимальной питательной среды при температуре 37 °С, при которой достигается высокая вероятность обнаружения и дифференциации всех видов исследуемых интактных микроорганизмов.

При коммерциализации предложенного принципа информационной технологии исходную базу данных следует получать в пределах одного эксперимента, для чего необходимо наличие многоканальных аппаратно-программных средств. Автоматизация одновременных исследований различных типов термограмм позволит значительно снизить трудоемкость и временные затраты проводимых исследований, уменьшить уровень случайных методических ошибок и повысить уровень достоверности обнаружения и дифференциации вида исследуемых микроорганизмов.

Литература

1. Bartram, A. K., Lynch M. D., Stearns J. C. et al. Generation of multimillion-sequence 16S rRNA gene libraries from complex microbial communities by assembling paired-end Illumina reads // Appl. Environ. Microbiol. – 2011. – Vol. 77. – P. 3846–3852.
2. Bizzini, A., Durussel C., Bille J., Greub G., Prod'homme G. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory // J. Clin. Microbiol. – 2010. – Vol. 48. – P. 1549–1554.
3. Ломинадзе, Г. Г., Семенова У. А., Мотузова О. В., Калакуцкая А. Н., Лазарева А. В. Использование метода MALDI-TOF масс-спектрометрии для ускорения идентификации микроорганизмов в гемокультурах пациентов с подозрением на сепсис // «Лаборатория ЛПУ» ФГБУ «РЦЗД» РАМН. – 2014. – № 4 (специальный выпуск). – С. 17–20.
4. Ueli von Ah, Diter Wirs, and A. U. Daniels Rapid def of methicillin-susceptible Staphylococcus aureus from methicillin-resistant S. aureus and MIC determi-

nations by isothermal microcalorimetry // Journal Clinical Microbiology. – 2008. – Vol. 46, № 6. – P. 2083–2087.

5. *Howell, M., Wirz D., Daniels A. U. and O. Braissant* Application of a microcalorimetric method for determining drug susceptibility in mycobacterium species // Journal Clinical Microbiology. – 2012. – Vol. 50, № 1. – P. 16-20.

6. *Кальве, Э., Прат А.* Микроорганизмы и культуры тканей / Микрокалориметрия; пер. с франц. – М., 1963. – С. 323–333.

7. *Zaharia, D., Muntean A., Popa M.* Comparative analysis of Staphylococcus aureus and Escherichia coli microcalorimetric growth // BMC Microbiology. – 2013. – №13(171). – P. 2–14.

8. *Драпеза, А. И., Лазарук С. К., Лобан В. А., Скороход Г. А., Плешко Н. В., Чекир Д. В. Гудкова Е. И.* Разработка конструкции устройства для информа-

Оригинальные научные публикации □

ционных технологий быстрого обнаружения и идентификации инфекционных агентов тепловыми методами // Сборник научных трудов «Современные методы и технологии создания и обработки материалов». ФТИ НАН Беларуси. – 2015. – Т. 1. – С. 139–145.

9. *Драпеза, А. И., Плешко Н. В., Лобан В. А., Скороход Г. А., Гудкова Е. И.* Метод дифференциальных термограмм на основе микротерморезисторов для ускоренной оценки жизнеспособности бактериальной популяции E. coli // Вестник БГУ. – 2015. – Сер. 1, № 1. – С. 30–36.

10. *Петри, А.* Наглядная медицинская статистика / А. Петри, К. Сэбин; пер. с англ. под ред. В. П. Леонова. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 168 с.

Поступила 27.09.2016 г.