

2002. The effect of maternal undernutrition on ovine fetal growth. *Journal of Endocrinology*, 173(1):131-41. 0022-0795/02/0173/131.

• PIAGGIO, L, QUINTANS G, SAN JULIÁN R, FERREIRA G, ITHURRALDE J, FIERRO S, PEREIRA ASC, BALDI F AND BANCHERO G. E. Growth, meat and feed efficiency traits of lambs born to ewes submitted to energy restriction during mid-gestation. *Animal*:12 (2), 256-264

• RHIND, S.M.; RAE, M.T.; BROOKS, A.N. 2001. Effects of nutrition and environment factors on the fetal programming of the reproductive axis. En: *Reproduction* 122: 205-214.

• ROVAI ML, THOMAS Y, BERGER, CAJA G. 2004. Udder morphology and effects on milk production and ease of milking in dairy sheep. *Proceeding of the 10th Annual Great Lakes Dairy Sheep Symposium*. p:79-114.

• Tizard IR. 2009. *Introducción a la Inmunología Veterinaria*. Capítulo 14: Los anticuerpos: receptores solubles de antígeno, Octava Edición

• TODD, S.E.; OLIVER, M.H.; JAQUIERY, A.L.; BLOOMFIELD, F.H.; HARDING, J.E. 2009. Periconcepcional undernutrition of ewes impairs glucose tolerance in their adult offspring. En: *Pediatric Research*, Vol. 64, n° 4.

• WALLACE JM, AITKEN RP, CHEYNE MA. 1996. Nutrient partitioning and fetal growth in rapidly growing adolescent ewes. *J Reprod Fertil*. 107(2):183-90. Wallace JM, Aitken RP, Cheyne MA. 1996. Nutrient partitioning and fetal growth in rapidly growing adolescent ewes. *J Reprod Fertil*. 107(2):183-90.

• WALLACE JM, DA SILVA P, AITKEN RP, CRUICKSHANK MA. 1997. Maternal endocrine status in relation to pregnancy outcome in rapidly growing adolescent sheep. *J Endocrinol*. 155(2):359-368. 0022-0795/97/0155-0359.

Jfundamentos y manejo de vacunas para la prevención de las diarreas y enfermedades respiratorias en terneros

Viviana Parreño

Instituto de Virología – INCUINTA, CICV y A INTA Castelar, Argentina.

La presencia de la Bca. PhD Viviana Parreño a las XLVI Jornadas Uruguayas de Buiatría fue posible gracias a la colaboración de Laboratorios Santa Elena S.A. - Virbac.

Incrementar la productividad ganadera mejorando la sanidad

La Cámara Argentina de la Industria de Productos Veterinarios (CAPROVE), lanzó en 2010 el "Plan Sanitario Productivo", cuya finalidad es difundir y promover en el medio profesional y ganadero el concepto de "incrementar la productividad animal a través de la Sanidad". El Plan Estratégico Agroalimentario y Agroindustrial Participativo y Federal, 2010-2016 (PEA2), impulsado por el Estado Nacional, estimaba que para el año 2020 se aumentaría el stock ganadero para pasar a faenar 3.8 millones de toneladas de carne bovina. Las proyecciones para el sector lechero estimaban un aumento de la

producción de leche para alcanzar 18.900 millones de litros en 2020.

Para alcanzar estos objetivos el plan propone realizar inversiones en la **SANIDAD** de los rodeos, especialmente en la implementación de herramientas de prevención (**vacunación**) que permitan incrementar los índices productivos (aumento de tasas de preñez, parición y destete), así como reducir los índices de pérdidas de terneros nacidos de manera de incrementar en 2.000.000 más por año la población de terneros, sin necesidad de incrementar el stock de vacas. El aumento del stock ganadero planteado debía ser acompañado de una mejora sustancial en la sanidad

de los rodeos, lo que implica entre otras cosas contar con vacunas de óptima calidad y desarrollar nuevas estrategias complementarias a la vacunación.

Por su parte, la continua expansión del cultivo de soja, ha ocasionado que la ganadería se desplace a regiones menos productivas (de la pampa hacia el resto de las regiones) donde los índices productivos son menores. En este contexto, el incremento de productividad por hectárea o por unidad productiva, se logra aplicando sistemas de cría intensiva (feed-lots, cría intensiva, destete precoz, etc.) que conllevan el aumento de animales por unidad de superficie y con ello, el incremento del riesgo sanitario. **Considerando este contexto, la aplicación masiva de vacunas y nuevos biológicos, probióticos, prebióticos y otras terapias de inmunidad pasiva en los rodeos representan la mejor estrategia sanitaria preventiva y terapéutica para combatir las enfermedades endémicas que**

afectan la productividad de las explotaciones ganaderas.

Evolución del stock ganadero Argentino en la última década

De los datos históricos recientes se observa que en 2008 Argentina contaba con alrededor de 58 millones de cabezas de ganado vacuno, número que descendió más de 9 millones en 2011 y que a partir de ese punto de inflexión comenzó a recuperarse lentamente a razón de ~790.000 cabezas por año hasta llegar a las cifras actuales (Figura 1A; *Análisis de regresión lineal entre 2011 y 2017, $y = 789952x - 50.000$, $R^2 = 0.91$*).

Al estudiar la evolución del stock de hembras y terneros entre 2011 y 2017, en relación al objetivo propuesto, se observa que finalmente en 2017 se ha aumentado en más de 2 millones el número de terneros y terneras logrados.



Figura 1-A. Evolución stock ganadero 2010 a 2017.

Evolución de stock de hembras y terneros entre 2011 y 2017

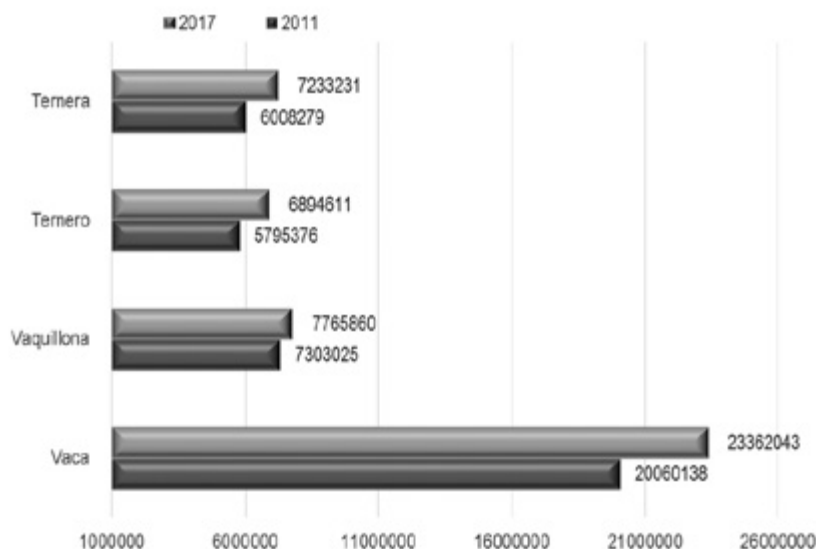


Figura 1-B. Evolución de stock de hembras y terneros entre 2011 y 2017.

Vacunas combinadas para Bovinos

En el mercado regional e internacional se dispone de un gran número de vacunas a **virus inactivados** destinadas a la prevención y control de enfermedades virales de los bovinos, que forman parte de los complejos respiratorio, reproductivo bovino y el síndrome de diarrea neonatal del ternero. Estas formulaciones pueden incluir antígenos bacterianos y distintas combinaciones de los siguientes antígenos virales:

Vacunas respiratorias y reproductivas:

- Virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR), o herpesvirus bovino 1
- Virus Parainfluenza 3 bovino (PI-3),
- Virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV),
- Virus Respiratorio sincitial bovino (BRSV),

Vacunas para la prevención de las diarreas neonatales del ternero:

- Rotavirus bovino (RVA Bovino)
- Coronavirus bovino (CoV Bovino)

Estas formulaciones polivalentes, están destinadas a facilitar la aplicación del calendario sa-

nitario y a atacar en forma simultánea una problemática de etiología compleja. Hasta el año 2008 no existía una metodología armonizada que permitiera controlar la calidad inmunogénica y la eficacia de estas formulaciones vacunales para cada uno de los agentes virales incluidos en las mismas. Esto podría comprometer la performance a campo de estas herramientas, causando un importante detrimento en la productividad del sector pecuario.

MERCADO Argentino de Vacunas combinadas para Bovinos

El mercado de vacunas combinadas para bovinos de Argentina está conformado por 9 empresas que elaboran anualmente entre 50 y 40 millones de dosis. La Figura 2 ilustra la relación entre cantidad de dosis y el stock bovino. Considerando que estas vacunas deben aplicarse en general en esquemas de dos dosis en diferentes etapas del ciclo productivo, la relación sugiere que la tasa de vacunación es baja.

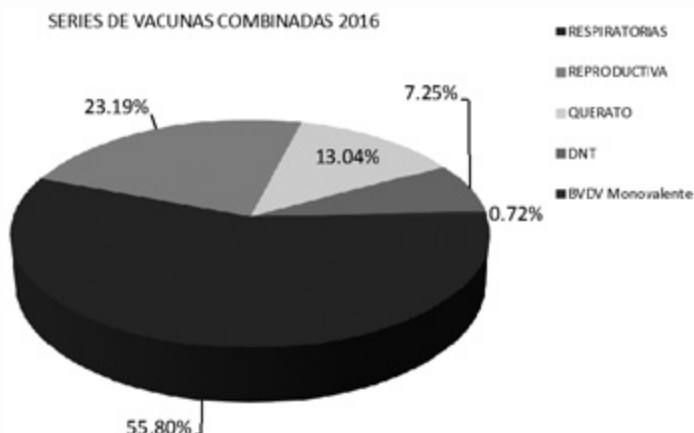
En el año 2016, se elaboraron 138 series (~40 millones de dosis) en su mayoría para prevenir las enfermedades respiratorias (Figura 3).



Figura 2. Cantidad de dosis de vacunas combinadas (series) elaboradas anualmente desde 2011 a 2016 y relación con el número de bovinos existentes.

Fuente: datos oficiales de SENASA.

SERIES DE VACUNAS COMBINADAS 2016



Tipo de vacunas	SERIES	PORCENTAJE	DOSIS
RESPIRATORIAS	77	55.80 %	22.433.225
REPRODUCTIVAS	32	23.19 %	9.847.640
QUERATO	18	13.04 %	3.866.415
DNT	10	7.25 %	3.961.155
BVDV Monovalente	1	0.72 %	58.700
Total	138	100.00 %	40.167.135

Figura 3. Distribución de vacunas combinadas según el tipo de síndrome aprobadas por SENASA Argentina en 2016.

Control de Calidad de las vacunas virales bovinas

En la comunidad Europea y en Estados Unidos, para que un laboratorio elaborador acceda a obtener la licencia (registro) de vacunas que contengan IBR, BVDV ó PI-3 en su formulación, los organismos de control sanitario (APHIS – CFR Norteamericano, Farmacopea Europea, Manual de animales terrestres de la OIE) exigen **ensayos de inmunogenicidad y eficacia en la especie destino**, que implica la vacunación de bovinos seronegativos susceptibles (CFR 1985; Products 1998; Products 1999) y en caso de que los títulos de anticuerpos (Ac) inducidos sean bajos, se somete a los animales a una prueba de desafío con el virus para evaluar la protección a la infección. Una vez aprobado el producto, el control de calidad de cada serie a liberar debe realizarse por medio de una **prueba de potencia que determine la inmunogenicidad** en bovinos ó en otro modelo de laboratorio (*in vivo* o *in vitro*) validado contra la prueba en la especie destino. En esas fuentes, no se cuenta con reglamentación internacional específica para evaluar la inmunogenicidad y eficacia para vacunas que contengan BRSV, RVA y CoV Bovino en su formulación.

La dificultad de contar con bovinos seronegativos para la mayoría de estos agentes endémicos en nuestros países y el elevado costo de las pruebas de inmunogenicidad en el hospedador natural, planteó la necesidad de desarrollar **pruebas estandarizadas** en un modelo animal de laboratorio que permitiera evaluar comparativamente la potencia de cada lote de vacuna, **en forma armonizada**. Así

nace en 2003 el desarrollo y validación estadística del **Modelo Cobayo INTA para el control de calidad de las vacunas virales bovinas**.

Modelo cobayo INTA para el control de Calidad de las Vacunas Virales Bovinas

A partir del año 2003 hasta la fecha, un grupo de investigadores del Instituto de Virología de INTA inició el desarrollo y validación de un **modelo cobayo para el control de las vacunas virales bovinas**. Para cumplir este objetivo el laboratorio certificó un sistema de gestión de calidad bajo normas ISO 9001, y se realizaron las pruebas que permitieron concretar la validación del modelo y las técnicas de ELISA asociadas para el virus de IBR, en 2008 (Parreño, Rodríguez et al. 2010; Parreño, Romera et al. 2010). En ese mismo año también se validó el modelo para el virus de PI.3 por la técnica de inhibición de la hemoaglutinación; y en 2012, se valida el modelo para Rotavirus junto a dos ensayos de ELISA, uno para medir el título de Ac IgG anti RVA en suero de cobayo y otro para medir específicamente el isotipo IgG1 anti RVA en suero de bovinos, dado que este isotipo es el que se transfiere de la hembra al ternero vía calostro y leche para lograr su protección frente a la diarrea neonatal (Parreño, et, al, 2004; Parreño et.al., 2010; Bok, et.al., 2018).



Figura 4. Modelo cobayo INTA Estado de validación según la valencia viral. SENASA controla en forma punitoria desde 2012 las vacunas de IBR y RVA, según la resol 598.12.

El protocolo de inmunización de cobayos se fijó en la aplicación de dos dosis de vacuna correspondiente a 1/5 del volumen de la dosis bovina, por vía subcutánea, con intervalo de 21 días, con una única toma de muestra de suero a los

30 días post vacunación (Parreño, Rodríguez et al. 2010; Parreño, Barros et al. 2010).

En función de la robustez alcanzada en la validación de la prueba para IBR y RVA, en el año 2012, **SENASA** emitió la resolución **sanitaria 598.12**, la cual adopta al modelo como control oficial de vacunas virales en Argentina para ambas valencias por ELISA.

Actualmente se continúa con la validación del modelo para el virus de BVDV, para el cual se cuenta con puntos de corte por neutralización viral (2017) y se encuentra en proceso de validación una técnica de ELISA basada en la tecnología de nanoanticuerpos VHH y la proteína E2 de BVDV. La Dra. Alejandra Romera y su equipo, (INTA) han desarrollado un ELISA para medir Ac contra el virus de PI.3 que se encuentra en proceso de validación para su uso con sueros de bovinos y cobayos. Finalmente, en 2017 se inició la validación del modelo y su ELISA para Coronavirus, todo en el marco del subsidio PICT Start up 667, MinciyT (Figura 4).

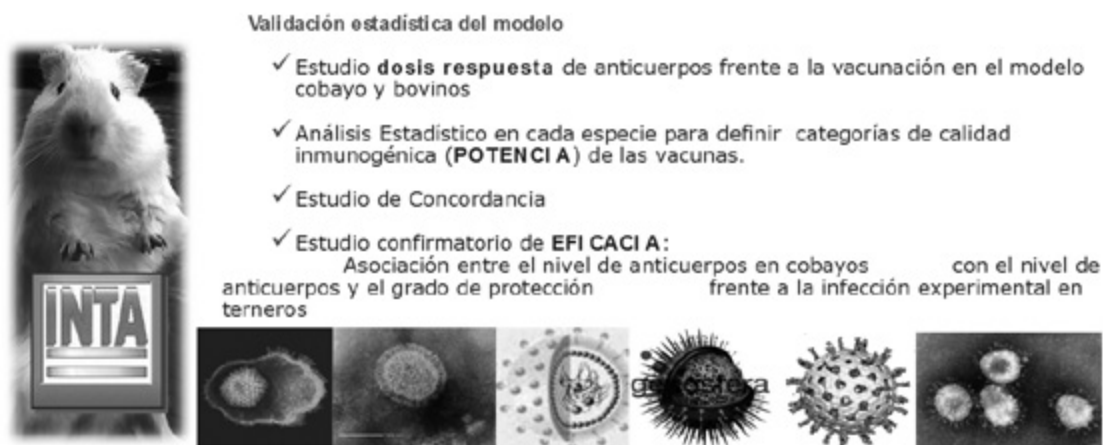


Figura 5. Cómo funciona el modelo: Herramienta predictiva de la inmunogenicidad de las vacunas en bovinos.

La prueba propuesta no necesita infraestructura ni tecnología sofisticada, sino solamente un bioterio con cobayos y laboratorio donde se efectúen técnicas serológicas corrientes, tales como como ELISA, seroneutralización (VN) e inhibición de la hemoaglutinación (IHA), todas ellas de uso rutinario en los laboratorios de virología. La validación estadística permite obtener puntos de corte en términos de títulos de Ac en cobayos que se corresponden con los títulos de Ac que la vacuna inducirá en bovinos. Esto se define como la calidad inmunogénica o **POTENCIA** de la vacuna (Figura 5). Según la valencia

viral las vacunas se clasifican como de calidad inmunogénica baja, satisfactoria o muy satisfactoria (Tabla 1). En el caso de contar con modelos de desafío viral en condiciones controladas en boxes de aislamiento, estos niveles de Ac en cobayos y bovinos se corresponden con grados de protección a la infección y /o enfermedad.

Tabla 1. Puntos de corte de calidad Modelo cobayo - Bovino.

Ag	Especie	Técnica	POTENCIA		
			No satisfactoria	Satisfactoria	Muy satisfactoria
	COBAYO	ELISA	< 1.93	1.93 ≤ X < 3.02	x ≥ 3.02
	COBAYO	VN	< 1.32	1.32 ≤ X < 2.05	x ≥ 2.05
IBR	BOVINO	ELISA	< 1.69	1.69 ≤ X < 2.72	x ≥ 2.72
	BOVINO	VN	< 1.27	1.27 ≤ X < 1.96	x ≥ 1.96
RVA	COBAYO	ELISA	< 1.96	1.96 ≤ X < 4.00	4.00 ≤ x ≤ 4.75
	BOVINO Título final t60	ELISA	< 3,53	3,53 ≤ X < 3,70	x ≥ 3,70
PI.3	COBAYO	IHA	< 1.5	1.5 ≤ X < 2.4	x ≥ 2.4
	BOVINO Título final t60	IHA	< 2.8	2.8 ≤ X < 3.1	x ≥ 3.1
BVDV	COBAYO	VN	< 1.37	1.37 ≤ X <	x ≥
	BOVINO Título final t60	VN	< 1.54	1.54 ≤ X <	x ≥

Resultados obtenidos hasta la fecha del control oficial de vacunas

SENASA aplica desde 2008, esta herramienta desarrollada por el INTA para controlar **una de las valencias (antígenos)** que componen las vacunas combinadas respiratorias y reproductivas: Herpesvirus Bovino 1 causal de rinotraqueitis infecciosa bovina (**IBR**) y una de las valencias que componen las vacunas combinadas entéricas: Rotavirus Bovino Grupo A (**RVA**). En la medida en que INTA avance con la validación de los métodos analíticos para otros antígenos, se anexarán a la resolución los puntos de corte para clasificar las vacunas para otros agentes virales.

En 2013 cuando se hizo efectiva la resolución, SENASA en colaboración con INTA controló el 37% de los lotes de vacunas que contenían IBR y el 32% de las vacunas que contenían RVA que fueron presentadas por la industria para su comercialización. Este punto es destacable dado que en otros países como Estados Unidos el USDA solo controla el 5% del total de vacunas que se elaboran anualmente.

el que la resolución sanitaria entró en vigencia la cantidad de vacunas de calidad satisfactoria para IBR pasó del 71%, en 2011 al 96.6%, en 2013. El porcentaje de vacunas controladas aumentó nuevamente en 2014 llegando al 42% para IBR con un nivel de aprobación del 71%.

Con respecto a RVA, el porcentaje de aprobación pasó del 40% en 2013 al 92% en 2014.

Desde 2015, INTA a través de INCUINTA abastece a SENASA de los kits de ELISA para evaluar anticuerpos contra IBR y RVA en cobayos, y a partir de ese momento la autoridad sanitaria lleva adelante el control en forma independiente (inmunización de cobayos y control serológico). En 2015, el porcentaje de vacunas aprobadas fue del 97.3% (73/75) y en 2016 del 95.6%(66/69). Estos resultados indican que la implementación del control se traduce en una mejora sustancial de la calidad de las vacunas presentes en el mercado.

Por su parte, INTA continúa prestando el servicio de control a las empresas, las que anualmente remiten vacunas y sueros para su evaluación. Asimismo, las empresas pueden adquirir los kits de ELISA para realizar sus controles internamente.

INTA presta servicios de ensayos a campo para

A partir de que se inició el control de sondeo del mercado y el momento en

pruebas de registro en bovinos. Cuenta con modelos de reproducción de la infección para evaluar eficacia para IBR, RVA, CoV y BVDV. Finalmente, el modelo cobayo también resulta útil para estudios de consistencia entre lotes y para estudios de estabilidad y extensión de vencimiento.

En paralelo con la implementación del control se comenzó un ciclo de cursos de capacitación, en dos formatos: un curso anual que se dicta en INTA desde el año 2010 a la fecha que esta destinado especialmente a estudiantes de postgrado; y cursos a medida que se dictan en las plantas productoras de vacunas. Esta modalidad se ha realizado con éxito en Argentina y en Uruguay y se espera poder replicarla en otros países de la región.

BENEFICIARIOS DE LOS NUEVOS CONTROLES DE VACUNAS:

- a) Los productores ganaderos** (usuarios finales de las vacunas)
- b) La industria de productos veterinarios** (Principales clientes privados).
- c) Las autoridades de sanidad animal de cada país** (Principal cliente público y ente adoptante de la tecnología para el control oficial de vacunas)
- d) CAMEVET OIE Foro internacional de asuntos regulatorios del comercio entre países de las Américas. Oficina regional de la OIE.**

En el año 2011 se creó en la Fundación PROSAIA una comisión de redacción de guías de recomendaciones para biológicos conformada por SENASA, INTA, representantes de las cámaras CAPROVE y CLAMEVET, así como especialistas del sector académico (CONICET y Universidades). Dicho foro elaboró un set de guías para el control de vacunas utilizando el modelo cobayo que fueron elevadas para su consideración al CAMEVET, oficina regional de la OIE para las Américas. Hasta la fecha se han votado por unanimidad tres guías como documentos CAMEVET, control de vacunas de IBR (Panamá, 2013), PI3 y RVA (Guatemala, 2015) y se espera que en el próximo encuentro se apruebe la guía de control de vacunas de BVDV.

IMPORTANCIA ESTRATEGICA: del cono sur hacia las AMERICAS

- Instalar en la región un método de control para las vacunas virales combinadas bovinas.**

- Fortalecer las capacidades de los países de la región de controlar la calidad de las vacunas veterinarias nacionales e importadas.**

- Otorgar CONFIABILIDAD a las vacunas producidas a nivel local**

- Facilitar el registro de vacunas en el ámbito del Mercosur y otras regiones.**

- Contar con un laboratorio de referencia regional que desarrolle, valide y ponga a disposición de los usuarios herramientas y reactivos que permitan el control de sus biológicos (KITS de ELISA, cepas virales, vacunas y paneles de sueros de referencia, etc).**

- Sistema de capacitación y control de calidad continua: cursos en planta y ensayos interlaboratorio.**

Agradecimientos

INTA

Marina Bok, Lucia Rocha, Vanesa Franco, Daniela Rodriguez, Nancy Suarez Perez, José Vallejos, Roxana Galarza, Alejandra Romera, Silvina Maidana, Andrea Pécora, Dario Malacari, Sol Perez Aguirreborrualde, Marina Mozgovej, Andres Wigdorovitz, Anselmo Odeón, Fernando Fernandez.

Sector privado

Maria Marta Vena, Jorge Filippi, Mercedes Isuel, Rodolfo Bellinzoni
Alejandro Meynhard, Pablo Halperin, Demian Bellido, Jorge Winokur

Equipo estadístico

Laura Marangunich, Maria Virginia Lopez
Comisión de Biológicos Fundación PROSAIA
Javier Pardo, Hugo Gleser, Alejandro Ham, y especialistas de cada área

SENASA

Eduardo Maradei, Virginia Barros, Ricardo Daloia, Valeria Gonzalez Thomas, Pilar Muntadas, Andrea Pedemonte.

Fondos CVT INTA sector privado

Agencia Promoción científica y técnica, Mincyt

Bibliografía

- Resolución 598/2012 SERVICIO NAC. DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA. MINISTERIO DE AGRICULTURA, GANADERIA Y PESCA VACUNAS VIRALES INACTIVADAS NO VESICULARES PARA BOVINOS REGLAMENTACION Publicada en el Boletín Oficial del 12-dic-2012. Número: 32541. Resumen REGLAMENTACION QUE PERMITA LA REGULACION DE LA ELABORACION, IMPORTACION, EXPORTACION, TENENCIA, DISTRIBUCION Y EXPENDIO DE LAS VACUNAS VIRALES INACTIVADAS NO VESICULARES PARA BOVINOS DE USO VETERINARIO. Se realizó la validación del modelo animal de laboratorio adoptado en la prueba y se colaboró en la redacción de reglamentación y anexos.
- **Guía para el control de vacunas contra IBR. Comisión ad-hoc de vacunas virales, PROSAIA. Elevada a CAMEVET en Octubre de 2011.** Comisión ad-hoc de países miembros: Argentina, Brasil, Colombia, Chile y USA. Guía aprobado como Documento CAMEVET por unanimidad en Panama, **Septiembre de 2014.**
- **Guía para el control de vacunas contra PI-3.** Comisión de vacunas virales, PROSAIA. Elevada a CAMEVET en Octubre de 2012. Aprobada como documento CAMEVET Noviembre 2015.
- **Guía para el control de vacunas contra Rotavirus.** Comisión de vacunas virales, PROSAIA. Elevada a CAMEVET en Septiembre de 2013. Aprobada como documento CAMEVET Noviembre 2015.
- **Guía para el control de vacunas contra el virus de la diarrea viral bovina.** Comisión de vacunas virales, PROSAIA. Elevada a CAMEVET en Octubre de 2016. Tramite III Camevet 2017.
- Development and Statistical Validation of a Guinea Pig model for Vaccine Potency testing against Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus (IBR). Parreño, V; López; MV; Rodriguez, D; Vena, MM, Izuel, M; Filippi, J; Romera, A; Faverin, C; Bellinzoni, R, Fernandez, F and Marangunich, L. Vaccine 28 (2010) 2539-2549.
- Standardization and Statistical Validation under ISO/IEC 17025 standards of an indirect ELISA to detect antibodies against BoHV-1 in Bovine and Guinea Pig serum. Parreño, Viviana, Romera, S. Alejandra; Makek, Lucia; Rodriguez, Daniela ;Malacari, Dario; Maidana Silvina; Compaired Diego; Combessies, Gustavo; Vena, Maria Marta ; Garaicoechea, Lorena; Wigdorovitz, Andrés; Marangunich, Laura and Fernandez, Fernando. J. Virol. Methods, 2010 Oct;169(1):143-53.
- STATISTICAL VALIDATION OF A GUINEA PIG MODEL AS A METHOD FOR BOVINE ROTAVIRUS VACCINES POTENCY TESTING. Viviana Parreno; Maria V. Lopez; Maria Vena; Daniela Rodriguez; Jorge Fillippi; Celina Vega; Gisela Marcoppido; Laura Marangunich; F. Fernandez. XI ds RNA Viruses Symposium. San Juan de Puerto Rico, 27-11/1-12-2012.
- "Modulation by colostrum-acquired maternal antibodies of systemic and mucosal antibody responses to rotavirus in calves experimentally challenged with bovine rotavirus." Parreno, V., C. Bejar, et al. (2004). Vet Immunol Immunopathol100(1-2): 7-24.
- Milk supplemented with immune colostrum: protection against rotavirus diarrhea and modulatory effect on the systemic and mucosal antibody responses in calves experimentally challenged with bovine rotavirus." Parreno, V., G. Marcoppido, et al. (2010). " Vet Immunol Immunopathol136(1-2): 12-27.
- Passive immunity to control Bovine coronavirus diarrhea in a dairy herd in Argentina. Bok M, Alassia M, Frank F, Vega CG, Wigdorovitz A, Parreño V. Rev Argent Microbiol. 2018 Jan - Mar;50(1):23-30. doi: 10.1016/j.ram.2017.03.007. Epub 2017 Oct 12.