



No. 12-002106- -00007-0000

Fecha: 2014-04-01 16:41:07 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 412 REPOSPRESRECU Folios: 26

Señor Superintendente
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
E. S. D.

Trámite : 011
Evento : 378
Actuación : 412

Referencia : Expediente No. **12.002.106**
Asunto : Solicitud de patente para: **"SUSTRATO RECUBIERTO CON INSECTICIDA PARA PORTEGER SERES HUMANOS Y ANIMALES DOMÉSTICOS"**
Solicitante : **BASF SE**
Fecha de solicitud : 6 de enero de 2012

I. RECURSO VÍA GUBERNATIVA

Yo, Oscar CORREA, en mi condición de apoderada de la sociedad **BASF SE** solicitante de la patente de la referencia, por el presente escrito atentamente manifiesto a usted que debidamente notificada de la Resolución No. **9939** del 21 de febrero de 2014, interpongo en su contra el recurso de **REPOSICIÓN**, para que sea revocada y en consecuencia se conceda el privilegio de patente de invención para **"SUSTRATO RECUBIERTO CON INSECTICIDA PARA PORTEGER SERES HUMANOS Y ANIMALES DOMÉSTICOS"** a favor de **BASF SE**.

II. OPORTUNIDAD DE LA IMPUGNACIÓN

La Resolución No. **9939** del 21 de febrero de 2014, con fecha de publicación listado 25 de febrero de 2014, fecha de vencimiento 25 de marzo de 2014, y fecha del término legal 1 de abril de 2014.

"EXCELENCIA LEGAL EN UN MUNDO SIN FRONTERAS"

BOGOTÁ - Edificio Siski - Carrera 4 No. 72 - 35 - Tel. (57-1) 347 3611 - Fax (57-1) 211 8650 - Fax in U.S.A: (1-305) 675 7743 - COLOMBIA
MEDELLÍN - San Fernando Plaza - Carrera 43 A No. 1 - 50 - Torre Protección Oficina 852 - Tel: (57-4) 520 4760 / (57-4) 326 0789 / (57) 317 365 8663 / (57) 318 532 2365- COLOMBIA

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

III. LA DECISIÓN RECURRIDA

- 3.1 Mediante la Resolución objeto de la presente impugnación, el Superintendente de Industria y Comercio decidió:
- 3.1.1 Denegar la patente de invención a la creación titulada: **“ESTRUCTURA TIPO LÁMINA INSECTICIDA PARA PROTEGER SERES HUMANOS Y ANIMALES DOMÉSTICOS”**.
- 3.2 En la parte motiva de la providencia, se mencionaron los siguientes fundamentos:
- 3.2.1 “Las reivindicación(es) 10 a 13, no puede(n) ser objeto de patente de acuerdo con lo establecido en la norma en comento, porque aunque el solicitante la(s) encabeza con la palabra ‘método’, en realidad está(n) referida(s) al uso del sustrato recubierto en forma de tela, que tiene una composición definida en la reivindicación 1”.
- 3.2.2 “Por otra parte las reivindicaciones 1 a 9, no cumplen con el requisito de nivel inventivo. Lo anterior, de acuerdo con las siguientes consideraciones”:
- 3.2.3 “En el presente caso, del sustrato recubierto reclamado en la solicitud no tiene nivel inventivo, teniendo en cuenta que la reivindicación 1 se refiere a: “Un sustrato recubierto en forma de tela, que tiene una composición que comprende: A) 0.1-45% en peso (sobre la base del total de A más B), donde A es una mezcla que consiste en A1) 99-1% en peso (sobre la base de A) de uno ó más piretroides A2) 1-99% en peso (sobre la base de A) de clorfenapir y B) 99,9 a 55% en peso (sobre la base del total de A más B) de un aglutinante de acrilato, obtenible por polimerización en emulsión de (...)”.
- 3.2.4 “La diferencia entre la estructura tipo lámina definida en la reivindicación 1 y las telas tratadas del documento D1, consiste en la composición pesticida de tratamiento. Mientras en esta solicitud se utiliza una composición que comprende la combinación entre clorfenapir y uno o más piretroides seleccionados del grupo

que consiste en alfa-cipermetrina, deltametrina, permetrina y lambda-cihalotrina en el documento D1 la composición de tratamiento considera esos mismos ingredientes insecticidas pero no combinados”.

- 3.2.5 “El efecto que se logra al utilizar una tela que ha sido impregnada con una mezcla insecticida que comprende clorfenapir y uno o más piretroides seleccionados del grupo que consiste en alfa-cipermetrina, deltametrina, permetrina y lambda-cihalotrina, es que se logra un buen control de insectos (incluyendo insectos resistentes a piretroides), en concentraciones bajas de ingrediente activo e incluso después de varios procesos de lavado”.
- 3.2.6 “Por lo tanto, el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: ¿cómo obtener telas tratadas con una composición insecticida que sea útil para el control de insectos resistentes a piretroides, incluso después de varios procesos de lavado?”.
- 3.2.7 “No obstante, las mezclas insecticidas entre clorfenapir y uno o más piretroides seleccionados del grupo que consiste en alfa-cipermetrina, deltametrina, permetrina y lambda-cihalotrina en las mismas proporciones de combinación de ingredientes activos, ya habían sido descritas en el documento D5. Dicho documento ya había divulgado combinaciones de acción insecticida mejorada que comprenden la mezcla de clorfenapir y un ingrediente activo piretroide, específicamente cipermetrina, deltametrina y permetrina. En D5 se indica que esas combinaciones insecticidas son útiles para el tratamiento de mosquitos (familia Culicidae)”.
- 3.2.8 “En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia, tiene toda la información a partir de la combinación de enseñanzas de los documentos D1 y D5 para plantear una tela tratada con una composición insecticida para el control de mosquitos como en D1, pero ahora impregnando la tela con la combinación sinérgica conocida que comprende clorfenapir y un derivado piretroide, descrita en D5 y que es útil para el control de mosquitos; con la plena expectativa de éxito de obtener una estructura tipo lámina, como un tela, útil para el control de mosquitos indeseables, como los mosquitos de la familia Culicidae entre los cuales se encuentra el Anopheles”.

3.2.9 “Así las cosas, esta Oficina concluye que la materia reclamada en el nuevo capítulo reivindicatorio, es una alternativa evidente que se deriva de manera obvia a partir del estado del arte citado, que no provoca ningún efecto técnico inesperado o sorprendente que pueda entenderse como un salto cualitativo en la técnica y que por lo tanto carece de nivel inventivo”.

3.2.10 “Esta Superintendencia aclara a la solicitante que:

- La actividad mejorada para la combinación insecticida entre clorfenapir y un derivado piretroide era un hecho ya conocido desde el documento D5, por lo tanto dicho efecto no puede entenderse como un efecto inesperado o sorprendente.

- El componente B del sustrato de la presente solicitud es igual al componente polímero del documento D1.

- Las cantidades de ingrediente activo respecto a la tela ya eran conocidas desde D1 y las proporciones de combinación entre clorfenapir y el derivado piretroide ya eran conocidas desde D5.

- Las telas tratadas con un aglutinante polimérico y un insecticida para el control de mosquitos indeseables y resistentes a procesos de lavado ya eran conocidas desde el documento D1. En dicho documento se consideran como ingredientes activos útiles los derivados piretroides e incluso el ingrediente activo clorfenapir. Ahora bien, pese a que el clorfenapir no es un derivado piretroide y se encuentra mal ubicado en el listado de insecticidas posibles en D1 es innegable que el documento D1 lo divulga y lo incluye como un posible insecticida para ser utilizado. Más aún, el técnico medio en la materia reconocerá dicho compuesto como un insecticida útil para el control de mosquitos indeseables, pues ya ha sido ampliamente documentado que el clorfenapir es útil para el control insecticida (especialmente control cepas de mosquitos resistentes a piretroides).

- Finalmente, el documento D5 proporciona dos enseñanzas fundamentales. Primero que no solamente se hace referencia al control de cucarachas y ácaros, sino que también se incluye el control insecticida de mosquitos indeseables de la familia Culicidae (página 2, líneas 40-41). Y segundo que en dicho documento se divulga la combinación sinérgica entre clorfenapir y un ingrediente piretroide en las mismas proporciones de combinación entre ingredientes activos acá contempladas (ejemplos)”.

3.2.11 “En consecuencia, la materia reclamada en la presente solicitud carece de nivel inventivo, y por ende, no cumple lo dispuesto en el artículo 18 de la Decisión 486”.

IV. OBJETO DEL RECURSO

De acuerdo con los argumentos que expongo a continuación, solicito atentamente a su Despacho lo siguiente:

1. Revocar el artículo segundo de la Resolución No. **9939** del 21 de febrero de 2014.
2. Conceder el privilegio de patente de invención para las reivindicaciones 1 a 9 para **“SUSTRATO RECUBIERTO CON INSECTICIDA PARA PORTEGER SERES HUMANOS Y ANIMALES DOMÉSTICOS”**, a favor de **BASF SE**.

V. FUNDAMENTOS DEL RECURSO

Respetuosamente me permito disentir de lo expuesto por ese Despacho en la Resolución objeto del presente recurso, toda vez que la presente solicitud sí cumple con el requerimiento de nivel inventivo exigido en la Decisión 486, como se demostrará a continuación

5.1 Antecedentes

De acuerdo a los fundamentos establecidos en la resolución pendiente, se tiene que las reivindicaciones 10 a 13 no son patentables por el hecho de hacer referencia a usos y las reivindicaciones 1 a 9 carecen de nivel inventivo en vista de las enseñanzas de los documentos **D1**: WO2005064072 y **D5**: EP0771526.

5.1.2 Sobre la Jurisprudencia en relación al análisis de nivel inventivo

El Tribunal Andino de Justicia se refiere a la forma de evaluar Nivel Inventivo en la Interpretación Prejudicial 36-IP-2010 en los siguientes términos:

(...) Del nivel inventivo:

“De conformidad con el artículo 18 de la Decisión 486, una invención goza de nivel inventivo al no derivar de manera evidente del estado de la técnica, ni resultar obvia para una persona entendida o versada en la materia. Este requisito ofrece al examinador la posibilidad de determinar si con los conocimientos técnicos que existían al momento de la invención, se hubiese podido llegar de manera evidente a la misma, o si el resultado hubiese sido obvio para un experto medio en la materia de que se trate, es decir, para una persona del oficio normalmente versada en el asunto técnico correspondiente”.

Con respecto a lo anterior, el Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina ha manifestado lo siguiente:

“En este punto conviene advertir que uno es el examen que realiza el técnico medio respecto de la novedad y otro el que se efectúa con respecto al nivel inventivo; si bien en uno y otro se utiliza como parámetro de referencia el ‘estado de la técnica’, en el primero, se coteja la invención con las ‘anterioridades’ existentes dentro de aquella, cada uno (sic) por separado, mientras que en el segundo (nivel inventivo) se exige que el técnico medio que realiza el examen debe partir del conocimiento general que él tiene sobre el estado de la técnica y realizar el cotejo comparativo con su apreciación de conjunto, determinando si con tales conocimientos técnicos existentes ha podido o no producirse tal invención”. (Proceso N° 12-IP-98. Interpretación prejudicial de 20 de mayo de 1998, publicada en Gaceta Oficial del Acuerdo de Cartagena N° 428, de 16 de abril de 1999)”.

Ahora bien, para los efectos del artículo 18 de la Decisión 486 resulta pertinente definir qué se entiende por “obvio” y por “evidente” y, en consecuencia, determinar qué se debe entender por nivel inventivo.

Lo obvio es “que se encuentra o pone delante de los ojos; muy claro o que no tiene dificultad. Mientras que lo evidente “certeza clara y manifiesta de la que no se puede dudar” [1]. Como se deduce, algo que resulte obvio no es necesariamente evidente; empero lo que es evidente, es también obvio.

En este orden de ideas, se puede concluir que una invención goza de nivel inventivo cuando a los ojos de un experto medio en el asunto de que se trate, se necesita algo más que la simple aplicación de los conocimientos técnicos en la materia para llegar a ella, es decir, que de conformidad con el estado de la técnica el invento no sea consecuencia clara y directa de dicho estado, sino que signifique un avance o salto cualitativo en la elaboración de la regla técnica.

5.1.3 La presente invención si posee Nivel Inventivo

En primera medida, se desea informar que se presenta un nuevo pliego reivindicatorio, de acuerdo con el artículo 34 de la Decisión 486, en el cual se eliminaron las reivindicaciones 10 a 13 que hacían referencia a usos y/o aplicaciones de la materia a proteger. De ésta manera el nuevo pliego reivindicatorio se encuentra compuesto por 9 reivindicaciones en total.

En respuesta a las objeciones hechas por falta de nivel inventivo de la presente invención frente a la combinación de las enseñanzas de los documentos D1 y D5, se presentan a continuación los siguientes argumentos a favor de dicho requisito.

Antes de entrar en detalle y con comparaciones con respecto a las enseñanzas de los otros documentos, es importante dejar claro más de una vez, que el objeto inventivo que la presente solicitud pretende proteger, radica en suministrar un insecticida permanente en una malla resistente al lavado que es activa contra cepas de mosquitos que son resistentes al piretroide.

Dicha invención se obtuvo mediante la impregnación de una malla, hecha a partir de una matriz de ligante acrilato, a partir de una mezcla de un piretroide y clorfenapir. En los ensayos realizados en ésta invención, demostraron que la combinación de clorfenapir y alfa-cipermetrina en conjunto con una base de ligante de acrilato, presenta una mayor eficiencia insecticida contra los mosquitos resistentes a los piretroides e inclusive tras de haber experimentado múltiples lavados, que en comparación con un insecticida a base de clorfenapir, exclusivamente.

Bajo dicho contexto, se tiene que en D1 no hay sugerencia ni motivación alguna de que se pueda obtener éste resultado mediante la combinación de clorfenapir y piretroides en conjunto con un ligante acrilato específico, como matriz polimérica. Por el contrario, D1 divulga una malla impregnada con un sistema de ligantes y un insecticida, que puede ser seleccionado dentro de varias opciones, sin embargo, en los ejemplos expuestos en dicho documento, únicamente se hace mención a un tipo de piretroide que actúa por sí solo.

Dentro de la lista que presenta D1 como posibles insecticidas a contemplar a para ésta aplicación, se encuentra el clorfenapir, clasificándolo dentro de la familia de los piretroides, sin tener en cuenta que dicho pesticida pertenece a la familia de pirroles. Siendo así las cosas, D1 no menciona la posibilidad de una mezcla insecticida compuesta por piretroides y pirroles, pero sí propone la combinación de piretroides con carbosulfanos (página 16, capítulo descriptivo de la presente solicitud).

En lo que respecta a D5, se tiene que dicho documento divulga composiciones pesticidas a base de clorfenapir y piretroides para el control de vectores o molestias pesticidas, tal y como lo son las cucarachas, ácaros de polvo, termitas y una gran cantidad de diferentes tipos de mosquitos. Sin embargo, D5 falla en ignorar la técnica de impregnación de mallas y por ende, no existe motivación alguna por parte de dicho documento, en utilizar su mezcla insecticida para impregnar una malla y generar así un nuevo producto insecticida. Adicionalmente a lo anterior, a partir de las enseñanzas de D5, no es posible que una persona del oficio versada en la materia, esté en la capacidad de deducir las proporciones exactas que presentan los componentes activos en la mezcla insecticida de la invención.

Sin embargo y aparte de las enseñanzas atribuidas por los documentos del estado de la técnica, es importante resaltar en éste punto que según la percepción de mi representada, en los análisis de patentabilidad realizados a ésta solicitud, no se le ha prestado la atención debida a la ciencia que implica producir un sistema compuesto por dos componentes activos, en combinación con un ligante adecuado, para la impregnación de mallas insecticidas. Como es de conocimiento para una persona del oficio versada en la materia, dicho sistema insecticida debe cumplir los requisitos de presentar un control adecuado en la liberación de los dos tipos de insecticidas y al mismo tiempo, manifestar su actividad insecticida cuando la malla ha sido impregnada mediante un lavado rápido.

Como se puede apreciar, tener un control adecuado en el comportamiento de cada uno de los insecticidas en un mismo sistema, no es tarea fácil y menos si se espera

un resultado predeterminado. Esta situación se confirma en diferentes estudios relacionados con el tema, de la siguiente manera:

“Cuando diferentes insecticidas se incorporan en una matriz polimérica, [...] la migración de cada uno de los insecticidas es difícil de controlar, debido que se puede presentar un promotor o inhibidor de migración de un insecticida o la misma sinergia puede influenciar en la migración del otro insecticida. Así, si lo que se está buscando, es una liberación determinada de diferentes tipos de insecticidas, realmente resulta en una tarea muy difícil de alcanzar” (WO2009003468, pág. 2, líneas 9.-15).

o,

“Se requiere de un gran ingenio para mejorar la actividad residual de un formulación existente y aún más, para determinar cuál es la estrategia más óptima para implementar ese producto en mallas insecticidas tratadas para mosquitos (ITN, por sus siglas en inglés) y en mallas insecticidas de larga duración (LLIn, por sus siglas ne ingles)”

(Raphael N' Guessan et al., Tropical Medicine and International Health, v. 14, n. 4, Abril 2009, págs. 389-395. Exactamente en pág. 394, col. Izquierda, último párrafo)

Adicionalmente, en el estudio de Pennetier, anexo al presente memorial, se tiene que dicho autor ratifica que las mezclas compuestas por repelentes/insecticidas y un componente que no es piretroide, impregnados en una malla, que han mostrado efectos sinérgicos a escala de laboratorio, no han presentado los mismos efectos a escala industrial y bajo las condiciones del medio (pág. 6, col. derecha, primer párrafo). Más adelante, hace énfasis en que conseguir una alta o significativa actividad insecticida a partir de una mezcla de un insecticida/repelente que impregna rápidamente un malla y que ésta expuesta a múltiples lavados, no es tarea fácil igualmente, sin embargo, las mallas insecticidas de la invención, al ser ensayadas bajo continuos lavados, presentaron excelentes actividades insecticidas (ver sección C, capítulo descriptivo).

De esta manera y resumiendo todos los argumentos previamente expuestos al presenta Despacho, se tiene por un lado que a pesar que D1 divulga el ligante acrilato y D5 por su parte, divulga mezclas insecticidas a partir de piretroides y clorfenapir, en conjunto, igualmente no conseguirían producir la mezcla insecticida en las proporciones efectivas dadas por la presente invención y por ende, tampoco se obtendría una malla con

una alta firmeza al lavado, manteniendo su efectiva actividad insecticida en condiciones convencionales de la práctica.

Por último, aún se presenta el argumento de que si dicho análisis de nivel inventivo no está basado en una práctica retrospectiva, lo que indicaría que sin tener conocimiento previo de las enseñanzas de la presente invención, no habría motivación alguna para combinar las enseñanzas de los documentos D1 y D5. En dicha situación, se le informa al presente Despacho que el INSTRUCTIVO DE EXÁMENES DE SOLICITUD DE PATENTES DE INVENCION Y MODELOS DE UTILIDAD, define éste análisis de la siguiente forma:

Análisis ex post facto o retrospectivo o hindsight

Es importante tener en cuenta que una invención reivindicada que, a primera vista, parece evidente, puede ser inventiva. Una vez formulada una nueva idea, a menudo se puede demostrar teóricamente el modo en el que se podría llegar a ella, a partir de algo conocido, a través de una serie de etapas aparentemente fáciles. El examinador de patentes debe evitar el uso de un análisis ex post facto de este tipo.

Es decir, el estado de la técnica se debe examinar sin el beneficio del conocimiento ofrecido retrospectivamente por la invención reivindicada. La indicación o la sugerencia que permita llegar a la invención reivindicada deben proceder del estado de la técnica o de los conocimientos generales de la persona del oficio normalmente versada en la materia, y no basarse en la divulgación del solicitante.

De ésta manera, se demuestra la altura inventiva que presenta la malla insecticida de la presente invención y por tanto supera las objeciones establecidas, fundamentadas en las enseñanzas de los documentos D1 y D5.

5.2 Conclusiones

Mediante un nuevo pliego reivindicatorio y argumentos técnicos y teóricos de la presente invención frente a aquellos expuestos en los documentos citados del estado previo de la técnica, se demuestra el nivel inventivo de la presente invención.

De esta forma, se considera que la presente solicitud cuenta con todos los requisitos necesarios para que le sea concedida la patente.

VI. PETICIÓN

Por todo lo anterior, solicito a ese Despacho lo siguiente:

6.1 Que al considerar las razones precedentes se revoque la decisión contenida en la Resolución No. **9939** del 21 de febrero de 2014, en cuanto resuelve negar en su artículo segundo el privilegio de patente de invención para las reivindicaciones 1 a 9.

6.2 Que se otorgue el privilegio de patente de invención para las reivindicaciones 1 a 9 para la solicitud de patente **“SUSTRATO RECUBIERTO CON INSECTICIDA PARA PORTEGER SERES HUMANOS Y ANIMALES DOMÉSTICOS”** a favor de **BASF SE**

VII. NOMBRE Y DIRECCIÓN

El nombre y la dirección de la solicitante recurrente son los siguientes:

BASF SE
67056 Ludwigshafen,
Alemania

VIII. NOTIFICACIONES

Atentamente manifiesto a usted que recibiré notificaciones en la Secretaria de su Despacho o en mi oficina de abogada situada en la Carrera 4ª. No. 72-35, piso 4º, de esta ciudad de Bogotá, D.C

IX. ANEXOS

- Formulario de modificaciones en solicitud pendiente
- Nuevo pliego reivindicatorio conformado por 9 reivindicaciones
- Comprobante de pago por concepto de modificaciones voluntarias, por un valor de \$128.000.
- Copia del artículo científico "*Synergy between Repellents and Organophosphates on Bed Nets: efficacy and Behavioural Response of Natural Free-Flying An. Gambiae Mosquitoes*". (Pennetier et al., PLoS ONE, v. 4, n. 11, Nov. 2009, e7896, p. 1-8)

Señor Superintendente,



OSCAR CORREA

C.C. 79.524.634 de Bogotá

T.P.A. No. 71.2027

COLO-16452-0841-069-3
AHAVAHA\ID-263055\WPC16452
No. M-2014-263055VAHA

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	Espacio reservado para el adhesivo de radicación
---	--

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
MODIFICACIONES Y/O CORRECCIONES

1. Identificación del Trámite

☐ Error material

☒ Modificación a una Solicitud en trámite

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Registro de Diseño Industrial

☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona Natural

☐

Persona Jurídica

☒

BASF SE

Nombre o denominación / Nombre o razón social completa

Nombre representante legal

Tipo de empresa Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☐ Otra ☐

Documento de identificación: ☐ C.C. ☐ C.E. ☐ NIT ☐ Otro Número _____

Nacionalidad/País de constitución	Dirección y domicilio del titular	Ciudad
Alemania	67056 Ludwigshafen, Alemania	Ludwigshafen
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
clientes@cavelier.com	2 11 86 50	3 47 36 11

☐ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del apoderado:

Apellidos y Nombre
Oscar Correa

Documento de identificación
C.C. 79.524.634

Tarjeta profesional
T.P.A. 71.027

Dirección y domicilio	Ciudad	
Carrera 4ª No. 72 –35	Bogotá	
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
cavelier@cavelier.com	2 11 86 50	3 47 36 11

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general

4. Datos del trámite

Corrección:

Expediente No 12.002.106

Aparece

Debe ser

Modificación:

☒ **Modificación al capítulo reivindicatorio.**

Presento nuevo capítulo reivindicatorio compuesto por 9 reivindicaciones y pido respetuosamente que el examen de patentabilidad sea realizado sobre estas nuevas reivindicaciones presentadas. Respetuosamente manifiesto que a pesar de eliminar materia del pliego reivindicatorio originalmente presentado, mi representada no renuncia a la protección que pueda obtener sobre dicha materia y se reserva el derecho de presentar una solicitud divisional que la contenga durante el trámite de la presente solicitud, beneficiándose de la fecha de prioridad inicialmente reivindicada.

☐ **Modificación al capítulo descriptivo.**

☐ **Modificación al resumen.**

☐ **Modificación a los dibujos.**

☐ **Modificación al solicitante.**

5. Anexos

☒ Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación por \$128.000.

☐ Poder, si fuere el caso.

☒ Documento que contiene las modificaciones o correcciones.

☐ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético.

6. Firma

Nombre y apellidos

OSCAR CORREA

C.C. 79.524.634 de Bogotá

Firma

Tarjeta Profesional 71.027

REIVINDICACIONES MODIFICADAS

1. Un sustrato recubierto en forma de tela, que tiene una composición que comprende:

(A) 0,1 a 45% en peso (sobre la base total de A más B) de una mezcla A que consiste en

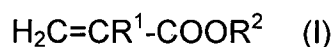
(A1) 99 a 1% en peso (sobre la base de A) de uno o más piretroides;

(A2) 1 a 99% en peso (sobre la base de A) de clorfenapir,

y

(B) 99,9 a 55% en peso (sobre la base total de A más B) de un aglutinante de acrilato, obtenible mediante polimerización en emulsión de

(B1) 20 a 93% en peso (sobre la base de B), de uno o más (met) acrilatos de la fórmula (I)



en la que

R^1 es H o CH_3 y

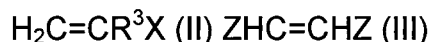
R^2 es un grupo alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ lineal o ramificado;

(B2) de 1 a 5% en peso (sobre la base de B) de al menos un monómero seleccionado del grupo que consiste de N-metilolacrilamida, N-metilolmetacrilamida, diamida N,N'-bismetilolmaléica y diamida N,N'-bismetilolfumárica;

(B3) 0,2 a 5% en peso (sobre la base de B) de al menos un monómero seleccionado del grupo que consiste de ácido acrílico, ácido metacrílico, ácido vinilsulfónico, ácido maléico y ácido fumárico;

(B4) 0 a 5% en peso (sobre la base de B) de al menos un monómero seleccionado del grupo de:

(B4A) monómeros de fórmula (II) y/o (III),



en donde los símbolos tienen los siguientes significados:

R^3 es H o CH_3 ,

X es: $\text{Z}, -\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CR}^3=\text{CH}_2$ ó $\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{COOR}^4$;

Z es CONH_2 , $\text{CONH}-\text{CH}_2-\text{OR}^5$, $\text{COO}-\text{Y}-\text{OH}$, CO-glicidilo, CHO ó $\text{CO}-\text{Y}-\text{OH}$;

Y es alquileo C_1-C_8 , y

R^4 , R^5 son idénticos o diferentes y son un grupo alquilo C_1-C_{10} , lineal o ramificado;

(B4B) acrilato de alilo, acrilato de metalilo, metacrilato de alilo, metacrilato de metalilo, maleato de dialilo, maleato de dimetalilo, fumarato de alilo, fumarato de metalilo, ftalato de dimetalilo, tereftalato de dialilo, tereftalato de dimetalilo, p-divinilbenceno y éter etilenglicol dialílico;

(B5) de 0 a 40% en peso (sobre la base de B) de al menos un monómero seleccionado del grupo que consiste de:

(B5A) acrilonitrilo, metacrilonitrilo, maleonitrilo y fumaronitrilo y/o,

(B5B) monómeros insaturados con etileno no polar diferente de B1a B4.

2. El sustrato de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el componente A1 de la composición se selecciona entre cipermetrina, alfa-cipermetrina, deltametrina, permetrina, ciflutrina, beta-ciflutrina, cihalotrina o lambda-cihalotrina.

3. El sustrato de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el componente A1 es alfa-cipermetrina.

4. El sustrato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el componente B1 del aglutinante acrilato B es acrilato de n-butilo.
5. El sustrato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el componente B2 del aglutinante de acrilato B es N-metilolacrilamida o N-metilolmetacrilamida.
6. El sustrato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el componente B3 del aglutinante de acrilato es el ácido acrílico.
7. El sustrato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que se encuentra en la forma de un material textil.
8. Una formulación insecticida acuosa para el recubrimiento de sustratos, que comprende una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
9. La formulación acuosa de acuerdo con la reivindicación 8, que contiene un agente de entrecruzamiento, que tiene grupos isocianato libres.

Synergy between Repellents and Organophosphates on Bed Nets: Efficacy and Behavioural Response of Natural Free-Flying *An. gambiae* Mosquitoes

Cédric Pennetier^{1*}, Carlo Costantini², Vincent Corbel³, Séverine Licciardi⁴, Roch K. Dabiré⁵, Bruno Lapiéd⁶, Fabrice Chandre¹, Jean-Marc Hougard⁷

1 UR016-CCPV (Caractérisation et Contrôle des Populations de Vecteurs), IRD (Institut de Recherche pour le Développement), Montpellier, France, **2** UR016-CCPV, IRD, Yaoundé, Cameroon, **3** UR016-CCPV, IRD, Cotonou, Benin, **4** UR016-CCPV, IRD, Saint-Denis, France, **5** IRSS (Institut de Recherche en Sciences de la Santé), Centre Muraz, Bobo-Dioulasso, Burkina-Faso, **6** RCIM, Université d'Angers, Angers, France, **7** UR016-CCPV, IRD, Dakar, Senegal

Abstract

Background: Chemicals are used on bed nets in order to prevent infected bites and to kill aggressive malaria vectors. Because pyrethroid resistance has become widespread in the main malaria vectors, research for alternative active ingredients becomes urgent. Mixing a repellent and a non-pyrethroid insecticide seemed to be a promising tool as mixtures in the laboratory showed the same features as pyrethroids.

Methodology/Principal Findings: We present here the results of two trials run against free-flying *Anopheles gambiae* populations comparing the effects of two insect repellents (either DEET or KBR 3023, also known as icaridin) and an organophosphate insecticide at low doses (pirimiphos-methyl, PM) used alone and in combination on bed nets. We showed that mixtures of PM and the repellents induced higher exophily, blood feeding inhibition and mortality among wild susceptible and resistant malaria vectors than compounds used alone. Nevertheless the synergistic interactions are only involved in the high mortality induced by the two mixtures.

Conclusion: These field trials argue in favour of the strategy of mixing repellent and organophosphate on bed nets to better control resistant malaria vectors.

Citation: Pennetier C, Costantini C, Corbel V, Licciardi S, Dabiré RK, et al. (2009) Synergy between Repellents and Organophosphates on Bed Nets: Efficacy and Behavioural Response of Natural Free-Flying *An. gambiae* Mosquitoes. PLoS ONE 4(11): e7896. doi:10.1371/journal.pone.0007896

Editor: Mike B. Gravenor, University of Swansea, United Kingdom

Received: June 10, 2009; **Accepted:** October 23, 2009; **Published:** November 19, 2009

Copyright: © 2009 Pennetier et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was financially supported by Agence Nationale pour la Recherche (ANR, program REACT no. 2006 SEST 030 01) and Osler Company (Melun, France). CP was supported by the French Foreign Ministry (International Volunteer fellowship) and François Lacoste and the Fondation de France (Student fellowship). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: This study was partly funded by Osler Company, France. Dr. Pennetier confirms that this does not alter the adherence to all the PLoS ONE policies on sharing data and materials.

* E-mail: cedric.pennetier@ird.fr

Introduction

Malaria control aims to reduce or to interrupt transmission, either by attacking the parasite in the human host, or by attacking the mosquito vector at its various stages. Usually a combination of methods, integrated to suit local conditions, needs and available resources, is the most effective, but also the most difficult to apply. Malaria parasites are now extensively resistant to the majority of cheap and easy to use anti-malarial drugs [1]. The problem of drug resistance and the absence of a malaria vaccine available for use in the tropics in the near future, call for increased emphasis on vector control strategies in the control of malaria [2,3]. To efficiently control plasmodium transmission by vectors, 1) the mosquito vector and its host-seeking behaviour must be well characterised and 2) the impact on the vector behaviour of vector control strategies and chemicals must be well studied.

In Western Africa, the major vector of malaria is *Anopheles gambiae* Giles *sensu stricto*, which is known to be anthropophilic, endophagic and endophilic [4,5]. These characteristics are part of

the reason that Insecticide Treated Nets (ITNs) are the mainstays of malaria vector control in these countries. Pyrethroids are recommended by the World Health Organization for bed net impregnation because they are effective at low dosages, fast acting, irritant and safe for humans [6]. Unfortunately pyrethroid resistance is widespread throughout Africa, especially with the target site mutation known as Knock down resistance (*Kdr*) [7,8,9,10,11]. Resistance mechanisms (i.e. *Kdr* and metabolic resistance mechanisms) might threaten sustainable vector control programs based on ITNs [12].

Recently, a new concept has been proposed: mixing a repellent and a non-pyrethroid insecticide on a net. Such mixtures showed similar features of pyrethroids, i.e. the lethal effect, knock-down effect and irritancy against susceptible and pyrethroid-resistant mosquitoes [13,14]. Two combinations (using pirimiphos methyl (PM), an organophosphate, and two repellents, diethyl-m-toluamide (DEET) and KBR 3023 also known as icaridin) were chosen to be tested in the field. Pennetier *et al.* [15] found that the bed nets treated with the two

mixtures were as effective as deltamethrin against susceptible mosquitoes, and more effective in killing *Anopheles gambiae* carrying *Kdr* or *Ace.1^R* resistance genes. Moreover the mixtures did not select for either the *Kdr* or the *Ace.1^R* alleles indicating that Repellent/Insecticide Treated Nets (RITNs) could be used to control insecticide-resistant malaria vectors [15].

The key factors in this promising strategy are quite volatile compounds, the repellents. As emphasized by Grieco *et al.* [16], chemicals cannot be classified based solely on their killing effect. They can disrupt contact between humans and malaria-transmitting mosquitoes not only by killing the mosquitoes. Indeed, the first host cues to reach a mosquito are (after carbon dioxide) volatile chemicals emanating from the skin, breath and waste products of a potential host, carried by air currents [17]. The probability that the mosquito responds to these cues and the strength of the response depend on the strength of the host-derived stimuli, the strength of competing external stimuli (e.g. odours from other sources, prohibitive wind speeds, etc.), the internal state of the mosquito (e.g. circadian phase, gonotrophic status, etc.) and its genotype (i.e. the genetic component of the responsiveness to given stimuli) [18]. ITNs constitute external stimuli sources because of chemicals on it, which are also released in their vicinity. *An. gambiae* behaviour in response to both human-derived stimuli and ITN stimuli is unknown, as is the behaviour in response to a physical barrier (untreated bed nets).

Usually, studies about ITNs efficacy evaluate the following parameters: deterrence, induced exophily, blood feeding inhibition and induced mortality. Using these indicators, we aimed to better understand the behavioural modifications and insecticidal efficacy induced by bed nets impregnated with PM/repellent mixtures and to investigate the involvement of the positive interactions between active compounds using experimental huts [19]. To do this, we compared the efficacies of the two mixtures with the compounds used alone on mosquito nets relative to an untreated net against free-flying malaria vectors in Burkina Faso, West Africa.

Methods

Study Area

Vallée de Kou (11°24'N; 04°24'W) is about 30 km north-west of Bobo-Dioulasso in the valley of the Kou River, a region where there has been extensive rice cultivation since the 1970s. This area contains 7 villages covering 7,200 ha surrounded by wooded savannah. As the Kou River flows all year round, it offers a permanent source of water for irrigation, hence allowing two crops of rice per year (July-November and January-May). The rice fields are highly productive permanent mosquito breeding sites, especially for the molecular form M of *An. gambiae*. In rainy season additional anopheline breeding sites appear, such as depressions and rain puddles, where the molecular form S is more prevalent.

Repellents and Insecticides

An organophosphate insecticide and two repellent products were evaluated separately and mixed on nets: "Pirigrain 250", a product produced by the company GGI (Compagnie Générale des Insecticides, France), is a formulation containing 25% Pyrimiphos methyl (PM); "DEET" is a formulation containing 30% diethyl-3-methylbenzamide (Deet); and "Icaridin®" or "Bayrepej®" is a formulation containing 25% KBR 3023, both produced by the company Osler, France. All three products were liquid (EC) formulations designed for clothing application. No other toxic or repellent chemicals other than those mentioned above were declared in the formulations.

Nets and Impregnation

Six polyester nets of 100 denier netting and 156 mesh size were used in the study. To simulate the usually reported torn nets usually reported, 6 holes each measuring 4 cm × 4 cm were cut in the sides and ends of the nets according to WHO guidelines [19]. The nets were impregnated before each trial with 150 mg/m² PM and 10 g/m² of both DEET and KBR, alone or in combination.

Experimental Huts and Mosquito Collections

Experimental hut procedures and mosquito collections were carried out as performed by Darriet *et al.* [20]. Briefly, adult male volunteers slept in the huts on mats under the nets from 20:00 to 05:00 each night after cleaning the hut at 18:00 to remove any spiders or other predators. To minimise bias in individual attractiveness, sleepers and bed nets were rotated between huts on successive nights following a Latin square. Awakening at 05:00, the sleeper closed the windows, lowered the curtain separating the room from the verandah, and collected live and dead mosquitoes from the room, bed net, and veranda. Female mosquitoes were scored as dead or alive, fed or unfed, and identified to species. Two trials, one in the dry season (May 5th to June 3rd) and one in the wet season (September 18th to October 14th, 2006) lasted each 27 nights.

The entomological impact of each treatment on mosquitoes was expressed relative to the control in terms of:

- Deterency: the reduction in the number of mosquitoes found in a treated hut.
- Exophily: the proportion of mosquitoes found in the veranda of a treated hut.
- Blood feeding rate: the proportion of mosquitoes caught that were blood fed.
- Overall mortality rate: the proportion of mosquitoes found dead immediately (at time of collection) and after 24 h to account for delayed mortality.

PCR Detection of Resistance Alleles

Genomic DNA was extracted from field-collected mosquitoes and PCR amplified to determine the presence of the molecular forms M or S using the method of Favia *et al.* [21]. Samples of live and dead mosquitoes were taken from the control hut for detection of *kdr* and *Ace.1^R* alleles in individual mosquitoes using respectively the methods of Martinez-Torrez *et al.* [7] and Weill *et al.* [22].

Statistical Analysis

The response variable y was the number of dead mosquitoes each day. The fraction of dead mosquitoes $p = y/n$ (where n is the total number of mosquitoes collected in the hut) was related to the time, the treatment of the bed net, the blood feeding rate $b = bfd/n$, the exophily $q = exo/n$ and the season in a logistic regression model with the software GLIM v.4 [23]. The model assumed a binomial error distribution with regression parameters calculated by maximum likelihood. The statistical significance of main effects and interactions terms in the model was tested by F-tests in an analysis of the deviance (ANODEV) by looking at the change in deviance caused by the removal of each term from the maximal model after having allowed for over dispersion in the data by calculating heterogeneity coefficients with the Williams algorithm [24,25]. Exophily and blood feeding rates were analysed following the same maximum likelihood procedures in GLIM v.4 software. Numbers of mosquitoes entered in the huts were related to time (days) in a model assuming a poisson error distribution with

Table 1. Frequency of the S molecular form of *An. gambiae*, of Knock Down Resistance (*Kdr*) allele and insensitive acetylcholinesterase (*Ace1^R*) allele.

	S form frequency (n tested)	Kdr frequency (n tested)	Ace1 ^R frequency (n tested)
Dry season	0,05 (43)	0,08 (41)	0,01 (40)
rainy season	0,85 (49)	0,88 (48)	0,40 (49)

Samples have been randomly taken in the control hut.
doi:10.1371/journal.pone.0007896.t001

regression parameters also calculated by maximum likelihood using GLIM v.4 software.

Ethical Considerations

Volunteers from the study village were recruited after obtaining informed written consent. A medical doctor was on hand during the trial to respond to any side effects of the ITNs or to treat any cases of fever. Confirmed *falciparum* parasitaemia was treated with Coartem (artemether 20 mg/lumefantrine 120 mg). The protocol received approval from the ethics committees of Centre Muraz (a national research centre) and Institut de Recherche pour le Developpement.

Results

Vector Population Composition and Insecticide Resistance Status

A total of 6932 *An. gambiae* sl has been collected among the two trials (3768 *An. gambiae* between May 8th and June 3rd 2006; 3164 *An. gambiae* between September 17th and October 13th 2006). Two

sub-samples of among 50 mosquitoes from the control hut of each trial were molecularly characterized for the molecular form and the resistance status. Molecular analysis revealed, as expected, a marked change between seasons in molecular form composition and insecticide resistance status (Table 1). During the dry season the molecular form S accounted for 5% of the *Anopheles gambiae* s.s. population, whereas at the end of the dry season it represented 85% of the sample. Accordingly, the *Kdr* allele, which confers resistance to pyrethroids, was found at a frequency of 8% in the *An. gambiae* s.s. sample during the dry season replicate and at 88% at the end of the rainy season. Similarly, the frequency of the *Ace1^R* allele, which confers resistance to organophosphates and carbamates, increased from 1% at the end of the dry season to 40% during the rainy season. The change in frequency of the insecticide resistance genes reflects the fact that these genes are found at high frequency only in the molecular form S of *An. gambiae*.

Deterrence

Analysis of the variance of the number of *An. gambiae* caught in huts with different treatments indicated that the only statistically lower density in treated huts occurred during the first week. Entry rates were significantly lower from the control for both KBR and PM+KBR treatments (95% confidence intervals did not overlap 0) (fig. 1c & 1e). PM, DEET and PM+DEET did not induce any differences from the control in terms of the *An. gambiae* entry rate during the 4 weeks (95% CI overlapped 0) (fig. 1a, 1b, 1d). Note that significantly more mosquitoes entered in huts where there were KBR and PM+KBR treated nets during the 3rd week, indicating an attractive effect of these bed nets (fig. 1c & 1e).

Exophily

In the minimal adequate model for the exophily data, there was neither difference between the control, PM and the two

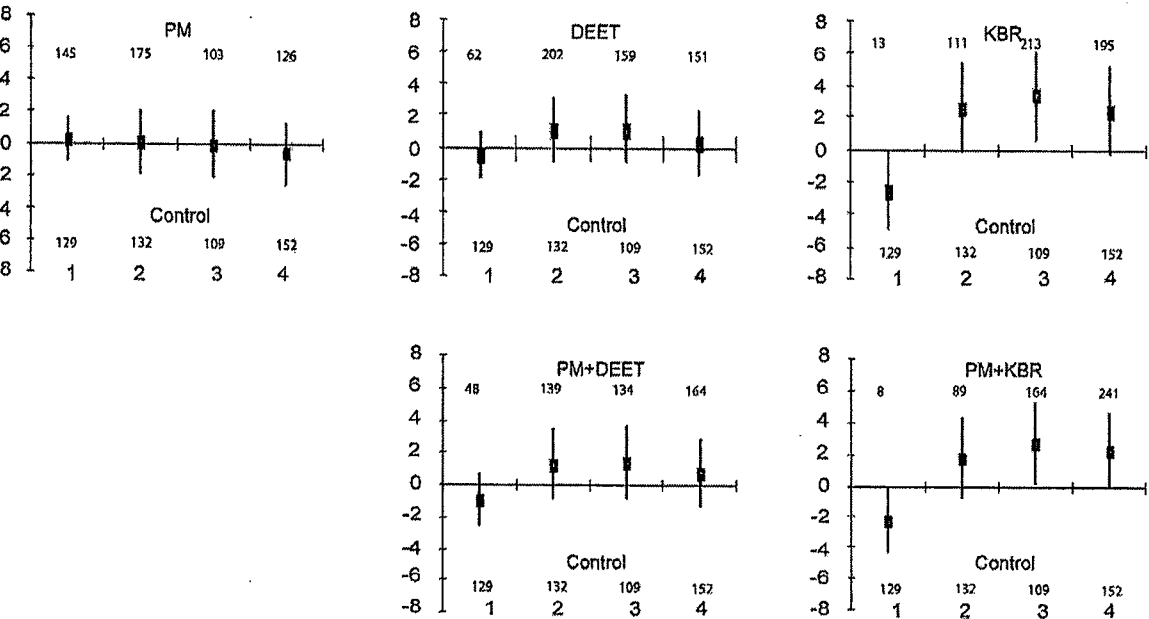


Figure 1. Log of the difference between numbers of mosquitoes entering treated hut and the control one, with 95% confidence intervals. Axis of abscissa represents the week numbers after the beginning of the trial. For each week are written the number of *An. gambiae* mosquitoes collected in the treated hut (at the top) and the number of *An. gambiae* mosquitoes collected in the control hut.
doi:10.1371/journal.pone.0007896.g001

repellents used alone nor between the two mixtures. Data of control, PM, DEET and KBR treatments have therefore been pooled (fig. 2a & 2b) as well as the data of the two mixtures PM+DEET and PM+KBR (fig. 2c & 2d). Exophily induced by the two mixtures (fig. 2c) was higher than the control and compounds used alone (fig. 2a) ($t=6.83$; $p<0.005$). The same trend was observed in rainy season but populations of *An. gambiae* seemed to be more exophilic than in dry season ($t=4.71$; $p<0.005$) (fig. 2b & 2d).

The involvement of the interactions in the exophily rate was tested in another model in which we replaced the factor “treatment” by two factors “repellent” and “insecticide”. This model allowed us to show that the interactions between PM and the two repellents are not involved in the increase of exophily ($F=1.52$; $p=0.22$). In others words, the increased exiting behaviour induced by the mixture treatments are not due to synergistic interactions between PM and the two repellents DEET and KBR but to additive effect of the compounds.

Blood Feeding

Blood feeding rates were constant within each trial in the control huts (fig. 3a & 3b). In dry season, it was higher (88.0 ± 2.0) than in rainy season (81.9 ± 2.0) ($t=3.73$; $p<0.05$). In the minimal adequate model for the blood feeding data, there is no difference neither between PM and the two repellents used alone nor between the 2 mixtures. Data of PM,

DEET and KBR treatments have therefore been pooled (fig. 3c & 3d) as well as the data of the two mixtures PM+DEET and PM+KBR (fig. 3e & 3f). However, the mixtures inhibited significantly more blood feeding than the repellent compounds used alone ($t=7.70$; $p<0.005$). The compounds used alone inhibited only 17% and 24% of the blood feeding respectively during the dry and rainy season (fig. 3c & 3d). The two mixtures inhibited 60% and 70% of the blood feeding respectively during the dry and rainy season (fig. 3e & 3f).

The involvement of the interactions in the blood feeding inhibition was tested in another model in which we replaced the factor “treatment” by two factors “repellent” and “insecticide”. This model allowed us to show that the interactions between PM and the two repellents are not involved in the decrease of blood feeding rate ($F=1.01$; $p=0.36$). In others words, the decreased blood feeding behaviour are not due to synergistic interactions between PM and the two repellents DEET and KBR but to additive effect of the compounds.

Mortality

The model that best fit the data took into account the main effects treatment and time and their interaction with the season. Exophily and blood feeding explain a significant part of the deviance of the mortality data depending on the treatment (respectively $f=17.05$; $p=0.043$ and $f=16.59$; $p=0.047$). At the beginning of the dry season trial, PM was killing less than 50% of exposed mosquitoes (fig. 4a). DEET and KBR were killing less

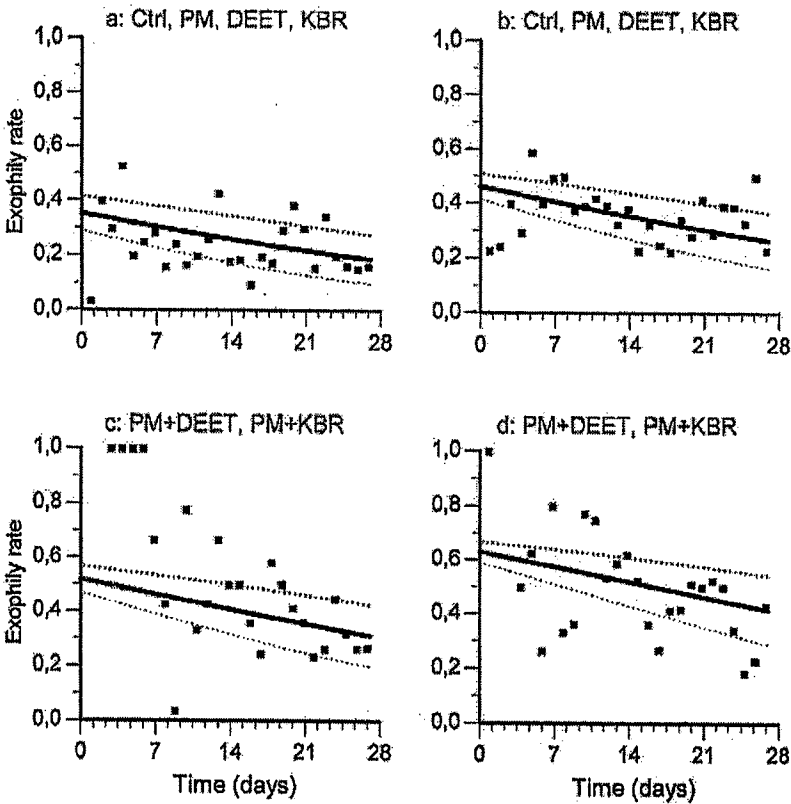


Figure 2. Exophily rates over time in the minimal adequate logistic regression model with standard error bounds. a and c illustrate the trial during dry season 2006; b and d illustrate the trial during rainy season 2006.
doi:10.1371/journal.pone.0007896.g002

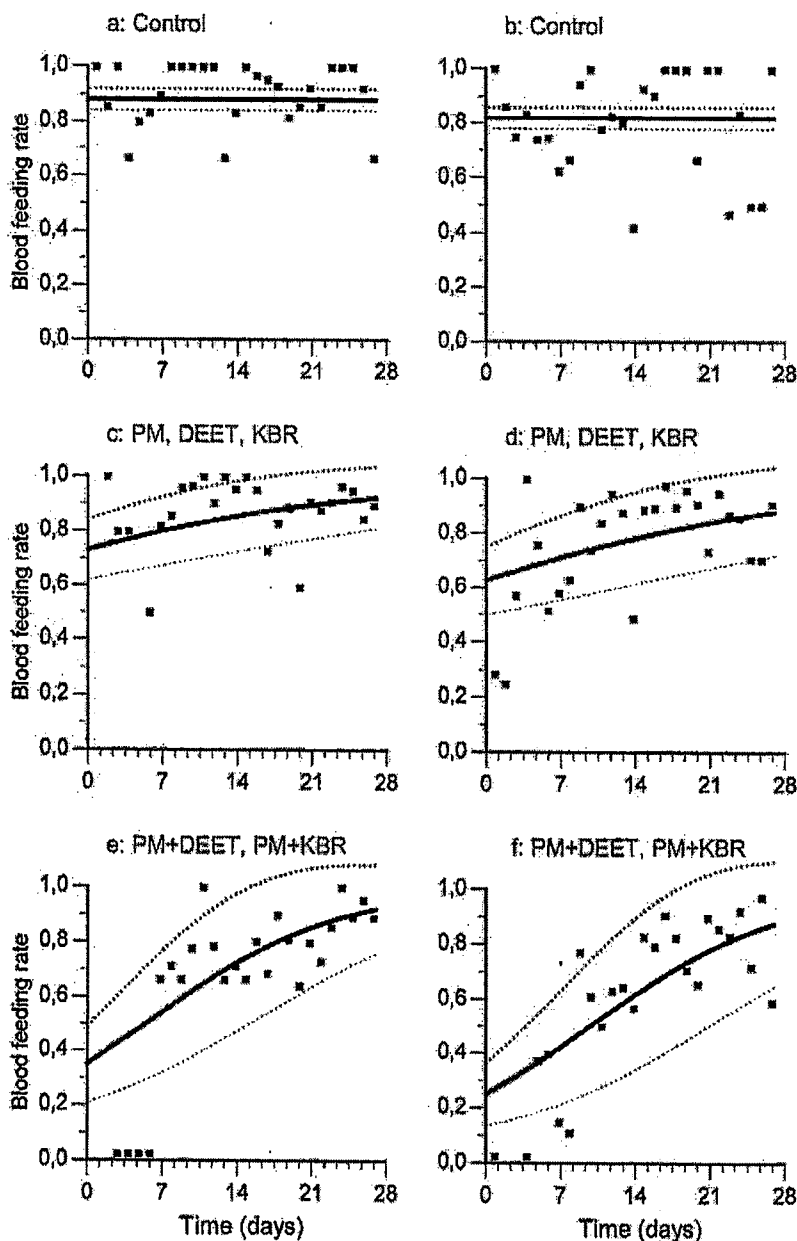


Figure 3. Blood feeding rates over time in the minimal adequate logistic regression model standard error bounds. a, c and e illustrate the trial during dry season 2006; b, d and f illustrate the trial during rainy season 2006.
 doi:10.1371/journal.pone.0007896.g003

than 30% (fig. 4c & 4e). In contrast at the same time, PM+DEET was killing 93% of mosquitoes that entered in the hut (fig. 4g) and PM+KBR about 99% (fig. 4i).

In the rainy season, the mortality at the beginning of the trial was significantly lower than in the dry season for PM, DEET and KBR used alone (fig. 4b, 4d & 4f). The mortality induced by PM+DEET did not decrease significantly in the rainy season ($t=0.98$; $p>0.05$) (fig. 4h), in contrast with PM+KBR ($t=4.32$; $p<0.005$) (fig. 4j). Moreover the maximal efficacy did not last as long as it did in dry season (fig. 4h & 4j).

The involvement of the interactions in the blood feeding inhibition was tested in another model in which we replace the factor "treatment" by two factors "repellent" and "insecticide". This model allowed us to show evidence of synergistic interactions between PM and the two repellents are involved in the mortality induced ($F=4.15$; $p=0.016$). The differences observed between the mixtures and compounds used alone are characteristic of their interactions. Positive interactions were greater between PM and KBR than between PM and DEET. Synergy amplitude was affected by the season change for PM+KBR ($t=4.32$; $p<0.01$) but

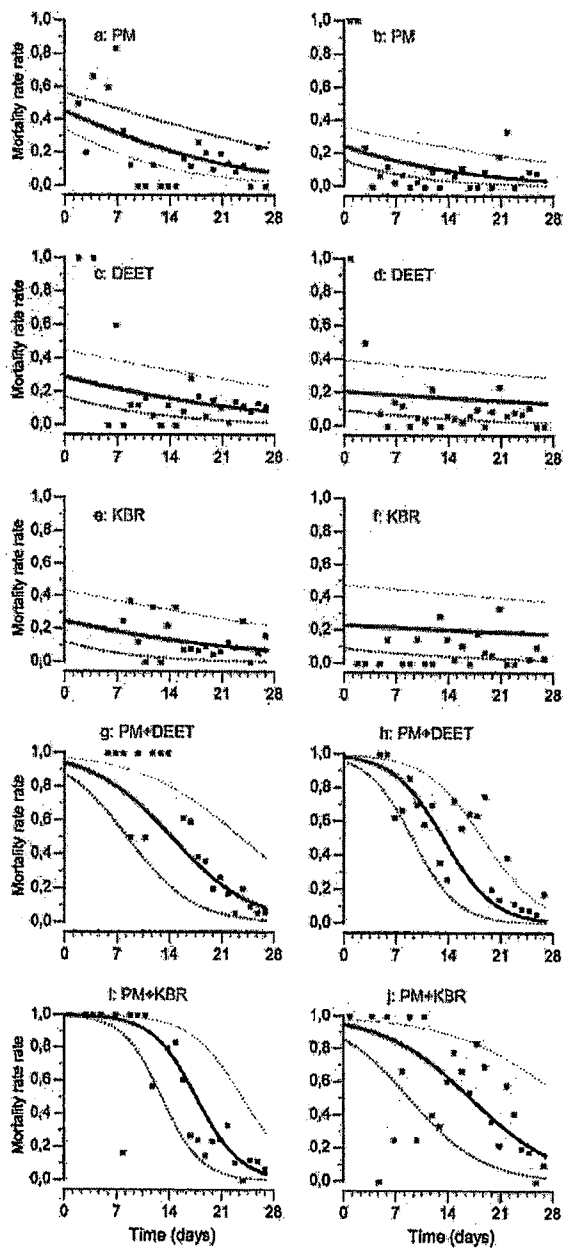


Figure 4. Mortality rates over time in the minimal adequate logistic regression model with standard error bounds. a, c, e, g and i illustrate the trial during dry season 2006; b, d, f, h and j illustrate the trial during rainy season 2006.
doi:10.1371/journal.pone.0007896.g004

not for PM+DEET ($t = 0.97$; $p > 0.05$). All the mortality estimates are summarized in the table 2. The mortalities induced by the two mixtures are much greater than the expected ones under the hypothesis of independent actions of the two compounds.

Discussion

Many field studies have been run with insecticide mixtures for which synergistic interactions have been observed in laboratory

Table 2. Mortality estimates (Standard Error SE) from the GLM model and expected mortalities under the hypothesis of independent action induced by all treatments in the huts during the dry and rainy seasons.

	Dry season		rainy season	
	Mortality	SE	Mortality	SE
Control	5,77%	9,49%	2,47%	3,42%
PM	45,13%	15,17%	24,22%	24,21%
DEET	29,16%	15,38%	20,34%	19,95%
KBR	25,12%	18,54%	22,01%	15,66%
Expected PM+DEET	61,13%		39,63%	
PM+DEET	93,67%	9,54%	97,67%	12,43%
Expected PM+KBR	58,92%		40,90%	
PM+KBR	99,74%	0,64%	94,07%	30,49%

doi:10.1371/journal.pone.0007896.t002

[26,27,28]. But none of these showed evidence of synergistic interactions in field conditions. Our results showed for the first time synergism in natural conditions against wild populations of the main malaria vector, *An. gambiae*. This synergy occurred between PM and the two repellents DEET and KBR, as previously demonstrated [14]. Moreover, the two mixtures PM+DEET and PM+KBR were still efficient against *An. gambiae* populations that shared the *Acel^R* and *Kdr* resistance genes at high levels (*Acel^R* freq = 0.40; *Kdr* freq = 0.88). A companion study showed that these two mixtures are more efficient than conventional pyrethroid-treated nets against susceptible and resistant *An. gambiae* populations and did not induce any additional selective pressure on the resistance genes, *Acel^R* and *Kdr* [15]. Criticisms on this new strategy of resistant malaria vector control focused on the short residual effect of the repellents [29]. However, companies are now working to develop long-lasting repellent formulations. For example, a micro-encapsulated formulation (MC) of DEET showed residual efficacy for up to six months in laboratory conditions [30,31]. Moreover, other DEET formulations are currently being evaluated in laboratory conditions and are showing the same efficiency one year after application one nets (Pennetier *et al*, unpublished data). So, it is not unrealistic to imagine that long-lasting repellent formulations will be available in the next few years.

The major factor preventing the immediate application of this kind of mixture on bed nets in the field is the lack of knowledge of the toxic properties of repellent-plus-OP mixtures. Indeed we used an OP with DEET which also acts as an acetylcholinesterase inhibitor [32] or with the KBR for which the mode of action is unknown. Despite the fact that these 2 repellents and PM are reported as safe products [33,34,35,36,37], little is known about the interaction of repellents with OPs. Moreover none of our compounds was applied on the skin. The contact between the user and the active ingredients on the bed net surface would be limited compared with a skin application, and the repellent concentration we used on nets was >3-fold lower than that recommended for a skin application (30% of DEET active ingredient in commercial lotions). Nevertheless, because a mixture of chemicals must be considered as a new chemical, assessing the risk of using repellent plus OP at the operational doses used to impregnate bed nets is crucial.

In the present study, blood feeding and exophily behaviour explained a part of the variability of the mortality of *An. gambiae* for the compounds when used alone, but not for the mixtures, indicating that the efficacy of the mixtures was not dependent on the mosquito behaviour in the experimental huts. Nevertheless the question of mosquito host-seeking behaviour in the presence of a physical barrier (bed net) or chemical (repellent on skin, ITNs, or volatile compounds in dwellings) is consequently crucial. Many fundamental studies have focussed on free host seeking behaviour (i.e. without any chemical or control tool) but there is a lack of knowledge about the behavioural accommodations of mosquitoes in the presence of treated materials as has been done for behaviour responses of Tsetse flies (*Glossina spp*) to a vector control tool like insecticide treated cattle [38], in order to improve the control strategies of human african trypanosomiasis [39].

Here, the objective was to better understand the impact of interactions between PM and the two repellents, DEET and KBR 3023 so we used quite low dosages. It would be interesting to study behavioural modifications and the insecticidal effect of PM and the two repellents at higher dosages to investigate the potentialities of using these compounds alone on bed nets [40]. Investigations on repellents are all the more important as we showed that the same chemical (KBR 3023) could be repellent or attractant according to its concentration, as has already been demonstrated for DEET [41].

Nevertheless, chemicals are only external stimuli added to human cues. Our results also showed a significant effect of the season on different indicators, *An. gambiae* populations in the rainy season were significantly more exophilic and significantly less aggressive than in the dry season. There are too many differences between these two populations (genetic background, meteorological conditions) to hypothesize about the cause. But this indicates that there might be differences in host-seeking behaviour between

the M and S molecular forms, between mosquitoes that are sharing different insecticide resistance genes, between mosquitoes with different parasitic status, or with different ecological or meteorological preferences. This information can lead us to improve the protocol of experimental hut trials, especially by including more variables (for example, parasitic status or meteorological data), and using a general model to take in account the impact of all these variables on the efficacy of different treatments. Standard protocols and new classifications proposed by Grieco *et al.*[16] should be the first step toward the establishment of general methods to evaluate new chemical proposed for malaria vector control.

In conclusion, our results showed a potential tool to manage resistant *An. gambiae*. Mixing OPs and repellents offered excitorepellency and mortality as required for protecting the sleeper and the community based on the positive interaction of the 2 chemicals. This concept will have practical potentialities for malaria control when long-lasting formulations of repellent are available. Generally, this study focused on the need to improve knowledge about mosquito vector host-seeking behaviour, particularly when treated materials are used.

Acknowledgments

We sincerely thank the team of VK7 for their excellence during field work, and the people of VK7 for their hospitality. We thank to Seth Irish, Thierry Lefèvre and Philip Agnew who provided helpful comments.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CP VC FC JMH. Performed the experiments: CP SL. Analyzed the data: CP CC. Contributed reagents/materials/analysis tools: RKD BL FC JMH. Wrote the paper: CP VC JMH.

References

- Peters W (1990) Plasmodium: resistance to antimalarial drugs. Ann Parasitol Hum Comp 65 Suppl 1: 103–106.
- WHO (2005) The world malaria report 2005. Geneva, World Health Organization: Available: <http://rhm.who.int/wmr2005/>.
- Greenwood BM, Bojang K, Whitty CJ, Targett GA (2005) Malaria. Lancet 365: 1487–1498.
- Costantini C, Gibson G, Sagnon N, Della Torre A, Brady J, et al. (1996) Mosquito responses to carbon dioxide in a west African Sudan savanna village. Med Vet Entomol 10: 220–227.
- Costantini C, Sagnon NF, della Torre A, Diallo M, Brady J, et al. (1998) Odor-mediated host preferences of West African mosquitoes, with particular reference to malaria vectors. Am J Trop Med Hyg 58: 56–63.
- Zaim M, Aitio A, Nakashima N (2000) Safety of pyrethroid-treated mosquito nets. Med Vet Entomol 14: 1–5.
- Martinez Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Berge JB, et al. (1998) Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector Anopheles gambiae s.s. Insect Molecular Biology 7: 179–184.
- Chandre F, Manguin S, Brengues C, Dossou Yovo J, Darriet F, et al. (1999) Current distribution of a pyrethroid resistance gene (kdr) in Anopheles gambiae complex from west Africa and further evidence for reproductive isolation of the Mopti form. Parasitologia 41: 319–322.
- Chandre F, Darriet F, Manga L, Akogbeto M, Faye O, et al. (1999) Status of pyrethroid resistance in Anopheles gambiae sensu lato. Bull World Health Organ 77: 230–234.
- Diabate A, Baldet T, Chandre C, Dabire KR, Kengne P, et al. (2003) KDR mutation, a genetic marker to assess events of introgression between the molecular M and S forms of Anopheles gambiae (Diptera: Culicidae) in the tropical savannah area of West Africa. J Med Entomol 40: 195–198.
- Diabate A, Brengues C, Baldet T, Dabire KR, Hougard JM, et al. (2004) The spread of the Leu-Phe kdr mutation through Anopheles gambiae complex in Burkina Faso: genetic introgression and de novo phenomena. Trop Med Int Health 9: 1267–1273.
- N'Guessan R, Corbel V, Akogbeto M, Rowland M (2007) Reduced efficacy of insecticide-treated nets and indoor residual spraying for malaria control in pyrethroid resistance area, Benin. Emerging Infectious Diseases 13: 199–206.
- Pennetier C, Corbel V, Hougard JM (2005) Combination of a non-pyrethroid insecticide and a repellent: a new approach for controlling knockdown-resistant mosquitoes. Am J Trop Med Hyg 72: 739–744.
- Pennetier C, Corbel V, Boko P, Odjo A, N'Guessan R, et al. (2007) Synergy between repellents and non-pyrethroid insecticides strongly extends the efficacy of treated nets against Anopheles gambiae. Malar J 6: 38.
- Pennetier C, Costantini C, Corbel V, Licciardi S, Dabire RK, et al. (2008) Mixture for controlling insecticide-resistant malaria vectors. Emerg Infect Dis 14: 1707–1714.
- Grieco JP, Achec NL, Charconviriyaphap T, Suwonkerd W, Chauhan K, et al. (2007) A new classification system for the actions of IRS chemicals traditionally used for malaria control. PLoS ONE 2: e716.
- Costantini C, Sagnon N, della Torre A, Coluzzi M (1999) Mosquito behavioural aspects of vector-human interactions in the Anopheles gambiae complex. Parasitologia 41: 209–217.
- Costantini C (1996) Odours for host-finding mosquitoes. Ciba Found Symp 200: 124–131.
- WHO, editor (2006) Guidelines for testing mosquito adulticides intended for Indoor Residual Spraying (IRS) and Insecticide Treated Nets (ITNs).
- Darriet F, N'Guessan R, Hougard JM, Traore-Lamizana M, Carnevale P (2002) [An experimental tool essential for the evaluation of insecticides: the testing huts]. Bull Soc Pathol Exot 95: 299–303.
- Favia G, Lanfrancotti A, Spanos L, Siden Kiamos I, Louis C (2001) Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of Anopheles gambiae s.s. Insect Molecular Biology 10: 19–23.
- Weill M, Malcolm C, Chandre F, Mogensen K, Berthomieu A, et al. (2004) The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. Insect Mol Biol 13: 1–7.
- Payne C (1987) The GLIM system release 3.77 Manual. Numerical Algorithms Group Ltd, Oxford.
- Collett D (1991) Modelling Binary Data. Chapman & Hall/CRC, London.
- Crawley M (1993) GLIM for Ecologists. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Hougard JM, Corbel V, N'Guessan R, Darriet F, Chandre F, et al. (2003) Efficacy of mosquito nets treated with insecticide mixtures or mosaics against insecticide resistant Anopheles gambiae and Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae) in Cote d'Ivoire. Bull Entomol Res 93: 491–498.

27. Guillet P, N'Guessan R, Darriet F, Traore-Lamizana M, Chandre F, et al. (2001) Combined pyrethroid and carbamate 'two-in-one' treated mosquito nets: field efficacy against pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus*. *Med Vet Entomol* 15: 105–112.
28. Asidi AN, N'Guessan R, Koffi AA, Curtis CF, Hougard JM, et al. (2005) Experimental hut evaluation of bednets treated with an organophosphate (chlorpyrifos-methyl) or a pyrethroid (lambda-cyhalothrin) alone and in combination against insecticide-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *Malar J* 4: 25.
29. Killean GF, Smith TA (2007) Exploring the contributions of bed nets, cattle, insecticides and excitorepellency to malaria control: a deterministic model of mosquito host-seeking behaviour and mortality. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*
30. N'guessan R, Pennetier C, Knols B, Rowland M (2007) Deet microencapsulation: a slow release formulation for long-lasting treatment of bednets. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*
31. N'Guessan R, Knols BJ, Pennetier C, Rowland M (2007) Deet microencapsulation: a slow release formulation for long-lasting treatment of bednets. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*
32. Corbel V, Stankiewicz M, Pennetier C, Fournier D, Stojan J, et al. (2009) Evidence for inhibition of cholinesterases in insect and mammalian nervous systems by the insect repellent deet. *BMC Biol* 7: 47.
33. Koren G, Matsui D, Bailey B (2003) DEET-based insect repellents: safety implications for children and pregnant and lactating women. *Cmaj* 169: 209–212.
34. McGready R, Hamilton KA, Simpson JA, Cho T, Luxemburger C, et al. (2001) Safety of the insect repellent N,N-diethyl-M-toluamide (DEET) in pregnancy. *Am J Trop Med Hyg* 65: 285–289.
35. Buka RL (2004) Sunscreens and insect repellents. *Curr Opin Pediatr* 16: 378–384.
36. Kendrick DB (2006) Mosquito repellents and superwarfarin rodenticides—are they really toxic in children? *Curr Opin Pediatr* 18: 180–183.
37. Tomlin CDS (2000) *The Pesticide Manual, a World Compendium*, 12th Ed. British Crop Protection Council, London, United Kingdom.
38. Torr SJ, Hargrove JW, Vale GA (2005) Towards a rational policy for dealing with tsetse. *Trends Parasitol* 21: 537–541.
39. Torr SJ, Maudlin I, Vale GA (2007) Less is more: restricted application of insecticide to cattle to improve the cost and efficacy of tsetse control. *Med Vet Entomol* 21: 53–64.
40. N'Guessan R, Rowland M, Moumouni TL, Kesse NB, Carnevale P (2006) Evaluation of synthetic repellents on mosquito nets in experimental huts against insecticide-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100: 1091–1097.
41. Mehr ZA, Rutledge LC, Buescher MD, Gupta RK, Zakaria MM (1990) Attraction of mosquitoes to diethyl methylbenzamide and ethyl hexanediol. *J Am Mosq Control Assoc* 6: 469–476.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

26

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0033910

Bogotá D.C., Marzo 28 de 2014 - 11:22:14

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	599246675	28/03/2014	9.588.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-03	CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICACIONES N. CREACION CORRECCION A SOLICITUD EN TRAMITE / MODIFICA	128.000.00	128.000.00
				\$128.000.00

SON: **CIENTO VEINTIOCHO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-002106- -00007-0000

Fecha: 2014-04-01 16:41:07 Dep. 2020 DIR. NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 412 REPOSPRESRECU Folios: 26

Código: 16452-841-069-3

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Marzo 28 de 2014 - 11:22:20