

STATO DI AVANZAMENTO DELLA RICERCA APPLICATA SULLA TECNICA DEL MASCHIO STERILE

Fabrizio Balestrino, Anna Medici, Roberta Colonna, Romeo Bellini – Centro Agricoltura Ambiente “G.Nicoli”, Crevalcore, Bologna

Introduzione

Negli ultimi 15 anni *Aedes albopictus* (Skuse), specie originaria del Sud-Est asiatico, si è diffusa in diversi continenti principalmente a causa del commercio internazionale di pneumatici usati (Reiter e Sprenger, 1987). In Europa questa specie comparve per la prima volta nel 1979 in Albania (Valzeille Falcoz, 1999) seguita dall'Italia nel 1990 (Dalla Pozza et al., 1994; Sabbatini et al., 1990). In Italia *Ae.albopictus* si è diffusa in gran parte del territorio nazionale con vari livelli di infestazione grazie alla sua adattabilità biologica e alla capacità di superare la stagione invernale producendo uova diapausanti (Romi, 1994). Nei nostri ambienti le possibilità di insediamento sono legate alla disponibilità di raccolte d'acqua artificiali, preferibilmente di piccole dimensioni, presenti perlopiù in ambiente urbano (caditoie stradali, bidoni, secchi, annaffiatoi, sottovasi, contenitori vari). L'ecologia dei focolai determina una distribuzione geografica a isole riferite alle aree urbane infestate. In ambiente naturale i siti idonei allo sviluppo larvale sono scarsi (perlopiù i cavi degli alberi) mentre, in ambiente rurale, i siti si trovano solo nei pressi dell'azienda agricola e difficilmente nel campo coltivato. Questa zanzara mostra scarsa propensione al volo attivo ma la colonizzazione di nuove aree è facilitata dal trasporto passivo di adulti da parte degli automezzi.

La rapida diffusione desta notevoli preoccupazioni in campo sanitario in quanto la specie potrebbe inserirsi nel ciclo di trasmissione di diversi arbovirus presenti o introdotti nel bacino del Mediterraneo. Oltre al rischio per la salute umana e animale, questa specie arreca notevole disturbo a causa della sua attività trofica, opportunistica ma fortemente antropofila e caratterizzata da estrema aggressività.

L'uso di molecole di sintesi per il controllo delle popolazioni di zanzare ha mostrato limiti a causa della insorgenza di resistenza nelle popolazioni soggette a continue somministrazioni (Sharma, 1985; Carter, 1989). L'insorgenza di resistenza, la bassa selettività degli insetticidi e il forte impatto inquinante sull'ambiente, spingono i ricercatori a valutare nuove strategie di lotta alle zanzare come il controllo biologico e genetico (Rai, 1996; Sharma, 1985; Service, 1983).

Le tecniche di controllo genetico, come ad esempio la tecnica dell'insetto sterile (SIT dall'inglese Sterile Insect Technique), l'incompatibilità citoplasmatica o le tecniche di traslocazione eterozigotica, vengono investigate dagli anni '50 ed hanno trovato campi applicativi di grande interesse contro diverse specie: *Cochliomyia hominivorax* in Centro America, la mosca tsetse (*Glossina* spp.) in Africa, la mosca della frutta (*Ceratitis capitata*) nel sud degli Stati Uniti per fare gli esempi più eclatanti.

Nei confronti delle zanzare i tentativi condotti negli anni '70-'80 si sono fermati in parte per ragioni di controversie politiche in parte perché mancavano le conoscenze centrali sulla bioecologia delle specie target.

Si riapre ora una nuova stagione che può contare su conoscenze di base più approfondite e sull'apporto delle nuove tecnologie sia nel campo di indagine genetico sia nella gestione dei dati territoriali.

In *Ae.albopictus* la distribuzione a isole centrate sulle aree urbane e la scarsa propensione al volo dispersivo sono caratteristiche essenziali per le possibilità applicative del progetto di lotta autocida attraverso l'impiego delle tecniche del maschio sterile (SIT).

I principali fattori di difficoltà connessi con lo sviluppo di una tecnica autocida efficace sono imputabili principalmente all'esigenza di disporre di un efficiente sistema di separazione dei sessi, alla necessità di rilasciare grandi numeri di individui sterili e quindi di disporre di grandi strutture per allevamenti massali, alla difficoltà di ottenere individui sterili sufficientemente vigorosi e competitivi con quelli fertili, alla rapida perdita di vigore, di adattamento all'ambiente naturale e di affinità con la popolazione selvatica da parte dei ceppi allevati in laboratorio.

Descrizione delle attività svolte

Nel corso dello studio sono state realizzate prove di laboratorio per l'ottimizzazione dell'allevamento massale allestito presso la struttura del CAA "G.Nicoli" a Crevalcore (Bo) esaminando nuove diete larvali al fine di ottenere una più elevata produttività in termini di pupe con tempi di impupamento e dimensioni delle pupe sufficientemente omogenei.

La necessità di incrementare la produttività di uova dell'allevamento ci ha spinto inoltre a valutare la possibile azione fagostimolante dell'ATP addizionato al pasto di sangue (Rutledge, 1964).

Le esperienze di irraggiamento sono state condotte utilizzando due diverse sorgenti radioisotopiche sterilizzanti ($Cs137$ presso il Dip. Fisica Sanitaria Ospedale S. Anna Ferrara e $Co60$ presso ENEA Casaccia Roma) sottoponendo le pupe maschili, ottenute in allevamento e sessate tramite setacciamento (Medici *et al.*, 2000), a radiazioni gamma direttamente in acqua. Sono stati investigati gli effetti sterilizzanti di diverse dosi di irraggiamento sulle pupe maschio e si sono compiute prove di irraggiamento su pupe maschili di diversa età per valutare eventuali alterazioni dello stato fisiologico e del livello di sterilità dei maschi in funzione del grado di sviluppo della metamorfosi. Il livello di competizione dei maschi irradiati con i maschi fertili è stato verificato attraverso prove di laboratorio (in cella climatizzata) e di campo (in tunnel serra a rete ombreggiante) mediante l'analisi dei livelli di fertilità delle femmine introdotte vergini nei diversi ambienti di prova.

Dopo aver realizzato una efficace struttura di allevamento con produttività potenziale pari a 100.000 pupe maschio per settimana e dopo aver convalidato l'attività sterilizzante di entrambe le sorgenti testate, si è proceduto alle prove di lancio dei maschi sterili. Gli esemplari maschili sterilizzati sono stati rilasciati in campo con cadenza settimanale nel periodo compreso tra il 14 Giugno e il 20 Settembre 2005, in località Santamonica (RN). L'area urbana di sperimentazione è stata scelta sulla base dei requisiti tecnici presentati da questa località. Santamonica risulta infatti un centro abitato infestato dalla Zanzara Tigre e circondato da zone naturali o agricole che costituiscono una parziale fascia di protezione rispetto all'immigrazione di femmine. Non possiamo comunque parlare di isolamento geografico dalle vicine aree urbane infestate per l'esigua profondità della fascia agricola (circa 500 metri).

Di seguito si riportano in dettaglio le prove realizzate nel corso della sperimentazione per l'applicazione delle tecniche SIT ad *Ae.albopictus*.

Prove sulla dieta larvale

Sono state condotte prove in vasche di plastica bianca (41x31x11 cm) con 4.000 larve in 3 litri di acqua dechlorata aggiungendo alla dieta standard solitamente utilizzata per gli allevamenti (2,5 mg/larva di biscotti per gatti *Friskies Adult* ® + 0,5 mg/larva di lievito di birra) 0,2 mg/larva di cibo per pesci *Tetramin* ®.

Alle larve la nuova dieta è stata fornita il 10% a 1 giorno, il 45% a 2 giorni e il restante 45% a 5 giorni di età.

Si sono analizzati i valori di impupamento delle larve e la quota di pupe maschili ottenibili con il setacciamento condotto su tutte le pupe ottenute a 7 giorni di età. Il sessaggio delle pupe è avvenuto utilizzando setacci metallici a maglie quadrate da 1.400 µm in acqua a 35°C per 4-5 minuti (Medici *et al.*, 2000)

Le prove hanno evidenziato una buona risposta nelle percentuali di impupamento e di produttività in termini di pupe senza però evidenziare miglioramenti significativi rispetto alla dieta standard. Con la dieta standard si ottiene un impupamento a 7 giorni del 65% delle larve allevate e il setacciamento a 1.400 µm delle pupe ottenute produce in media il 98,5% di maschi nel setacciato. Con la dieta standard la percentuale di maschi ottenuti sulle larve iniziali va dal 20 al 25%. Con la somministrazione della dieta integrata con *Tetramin*® il valore di impupamento medio a 7 giorni è del 67% e la percentuale di maschi nel setacciato a 1.400 µm è risultata del 98,3%. I maschi ottenuti con la nuova dieta in rapporto al numero di larve iniziali allevate è stato del 27%. In Tab.8.1 vengono riportati i dati ottenuti con la dieta Tetramin®.

Tab.8.1 - Dieta integrata 2005

4.000 larve in 3 litri

<i>n° repliche</i>	<i>impupamento a 7 giorni (%)</i>	<i>maschi nel setacciato (%)</i>	<i>femmine nel setacciato (%)</i>	<i>maschi ottenuti sulle larve iniziali (%)</i>
1	81,3	100,0	0,0	25,5
1	69,2	99,0	1,0	35,5
1	55,9	97,5	2,5	25,5
1	64,9	99,2	0,8	22,7
1	65,7	94,8	5,2	28,4
1	62,5	99,3	0,7	25,5
6	66,58 ± 0,08	98,30 ± 0,02	1,70 ± 0,02	27,18 ± 0,04

Come riportato da Timmermann e Briegel (1999) la dieta larvale va strutturata con l'obiettivo di garantire un ampio range di elementi nutritivi evitando così il rischio di carenze o sub-carenze che possano influire negativamente sulla produttività dell'allevamento e sulle condizioni di vigore dei maschi.

Inoltre, secondo Reisen *et al.* (1980, 1982), l'influenza negativa dell'allevamento sulla competitività dei maschi nella fase di accoppiamento potrebbe essere di maggiore peso rispetto all'influenza dell'irraggiamento.

Nella realizzazione dell'allevamento massale per la produzione di maschi da irraggiare, si è ritenuto quindi opportuno mantenere la nuova dieta testata che garantisce uno spettro nutritivo più ampio e vario. Ulteriori prove saranno necessarie per verificare i dosaggi / larva della dieta al fine di ridurre la quantità di residuo alimentare nelle vasche di allevamento che potrebbe influenzare negativamente il regolare sviluppo larvale.

Prova ATP

Sono state condotte prove di laboratorio per la verifica dell'efficacia fagostimolante di ATP nel pasto di sangue offerto alle femmine. Sono state preparate 6 gabbie (30 x 30 x 30 cm) contenenti ciascuna 50 femmine di 6 giorni di età. Tre gabbie sono state alimentate con sangue bovino defibrinato (6 ml sangue per gabbia) e tre con sangue bovino defibrinato addizionato con ATP (6 ml di sangue + 0.017g di ATP). Il sangue è stato offerto alle zanzare alla temperatura di 37°C per 20' in ogni gabbia.

Il sangue utilizzato è stato fornito alle femmine attraverso l'impiego di un riscaldatore a coppa termostata, evitando quindi l'utilizzo di animali vivi in laboratorio. L'analisi della prova è avvenuta attraverso la valutazione del numero di femmine con pasto e del relativo numero di uova deposte per femmina. Dopo 6 giorni è stata replicata la prova in tutte le gabbie utilizzando le stesse femmine (Tab.8.2).

Seppure con l'integrazione di ATP sia stato registrato un sensibile incremento della produttività di uova, l'analisi statistica dei risultati (Tab.8.3) non evidenzia differenze significative in nessuno dei parametri considerati tra il campione nutrito con ATP e il testimone costituito da femmine con pasto di sangue senza ATP aggiunto.

Tab.8.2 - Prova ATP

50 femmine/gabbia - età 6 gg

<i>Gabbia</i>	<i>N</i>	<i>n° femmine pasto</i>	<i>n° uova deposte</i>	<i>uova/femmina</i>
Test	6	14,50 ± 4,51	797,67 ± 387,02	53,28 ± 13,66
ATP	6	19,00 ± 3,22	942,00 ± 179,06	49,78 ± 7,82
All Grps	12	16,75 ± 4,41	869,83 ± 297,22	51,53 ± 10,76

50 femmine/gabbia - età 12 gg

<i>Gabbia</i>	<i>N</i>	<i>n° femmine pasto</i>	<i>n° uova deposte</i>	<i>uova/femmina</i>
Test	6	24,33 ± 7,58	1286,17 ± 227,30	55,19 ± 10,89
ATP	6	29,83 ± 3,13	1617,33 ± 291,63	53,99 ± 6,11
All Grps	12	27,08 ± 6,23	1451,75 ± 303,40	54,59 ± 8,44

Tab.8.3 - Analisi della varianza - ATP vs Test

effetti significativi per $p < 0,05$

<i>età 6 gg</i>	<i>SS</i>	<i>gl</i>	<i>MS</i>	<i>SS</i>	<i>gl</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
n° femmine pasto	60,8	1,0	60,8	153,5	10,0	15,4	4,0	0,1
n° uova deposte	62496,3	1,0	62496,3	909243,3	10,0	90924,3	0,7	0,4
uova / femmina	36,6	1,0	36,6	1237,7	10,0	123,8	0,3	0,6

<i>età 12 gg</i>	<i>SS</i>	<i>gl</i>	<i>MS</i>	<i>SS</i>	<i>gl</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
n° femmine pasto	90,8	1,0	90,8	336,2	10,0	33,6	2,7	0,1
n° uova deposte	329014,1	1,0	329014	683566,2	10,0	68356,6	4,8	0,1
uova / femmina	4,3	1,0	4,3	779,3	10,0	77,9	0,1	0,8

Riduzione di fecondità del ceppo allevato

Dai risultati emersi in questa prova abbiamo inoltre potuto osservare come la fecondità media della colonia di *Ae.albopictus* in allevamento presso il CAA abbia subito un significativo calo rispetto ai parametri precedentemente osservati (Tab.8.4 e Tab.8.5.), con una diminuzione percentuale di uova deposte per femmina pari a circa il 28%. I nostri ultimi studi relativi alla fecondità delle femmine del ceppo in allevamento mostravano infatti una media di uova deposte per femmina pari a 74.2 ± 5.9 quando nutrite con sangue bovino (Bellini, 2005).

Tab.8.4 - Diminuzione fecondità relativa alle precedenti analisi

	<i>N</i>	<i>uova/femmina</i>	
Bovino	3	74,24 ± 5,97	a
ATP	6	49,78 ± 7,82	b
TEST	6	53,28 ± 13,66	b
All Grps	15	56,07 ± 13,58	

Lettere diverse indicano differenze significative (Test di Newman – Keuls)

Analisi della varianza; effetti significativi per $p < 0,05$

	<i>SS</i>	<i>gl</i>	<i>MS</i>	<i>SS</i>	<i>gl</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
uova / femmina	1274,505	2	637,252	1308,899	12	109,074	5,8423	0,0169

Tab.8.5 - Variazione fecondità pre e post prova ATP

	<i>N</i>	<i>uova/femmina</i>	
PRE	3	74,24 ± 5,97	a
POST	12	51,53 ± 10,76	b
All Grps	15	56,07 ± 13,58	

Lettere diverse indicano differenze significative (Test di Newman – Keuls)

Analisi della varianza; effetti significativi per $p < 0,05$

	<i>SS</i>	<i>gl</i>	<i>MS</i>	<i>SS</i>	<i>gl</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
uova / femmina	1237,903	1	1237,90	1345,500	13	103,500	11,9604	0,0042

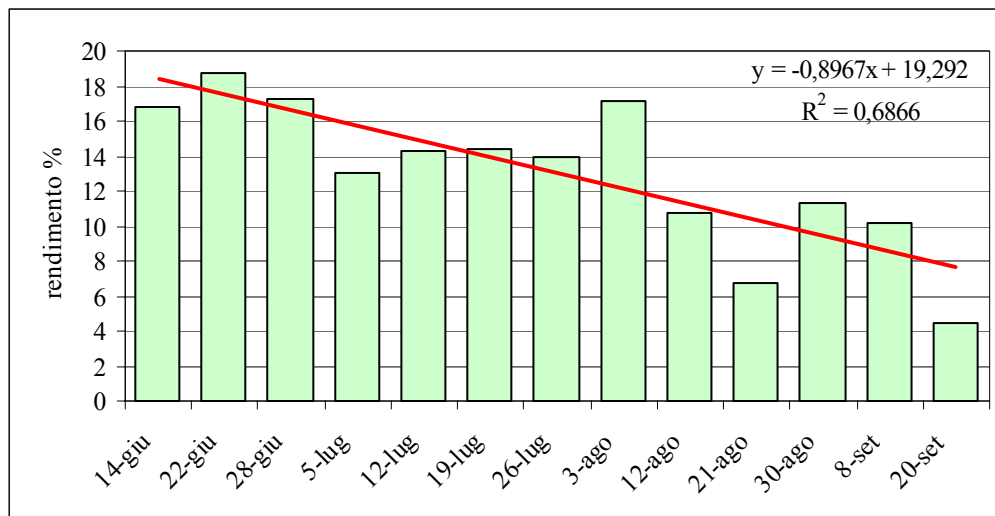
Questo fenomeno potrebbe essere imputabile a diversi fattori che andranno indagati: in primis l'infezione del ceppo con agenti patogeni e la depressione da inbreeding del ceppo allevato.

Rendimento dell'allevamento

Il rendimento dell'allevamento viene calcolato come il rapporto tra il numero di pupe maschio ottenute e le larve di prima età allevate. La produttività di pupe maschili dell'allevamento massale nel corso della stagione 2005 è andata gradualmente diminuendo dal $17 \pm 2,7$ % (16,8% media valore registrato a Giugno 2005) al $7,3 \pm 4,1$ % delle larve allevate (4,5% media valore registrato a Settembre 2005) (Fig.8.1).

Tale calo potrebbe essere ricondotto a una possibile infezione del ceppo in allevamento. Risulta necessario, per il proseguimento della sperimentazione, accertare la presenza infettiva e, se confermata, intervenire risanando le strutture e il materiale di allevamento.

Fig.8.1 - Rendimento allevamento massale nella stagione 2005 (calcolato sul numero di pupe maschili prodotte sul numero di larve iniziali)



Prove di irraggiamento delle pupe maschili

Le prove di irraggiamento sono state condotte utilizzando l'impianto di irraggiamento al Cobalto 60 "Calliope" presso l'ENEA Casaccia (Roma) e l'irradiatore per emoderivati al Cesio 137 del Dipartimento di Fisica Sanitaria dell'Ospedale S. Anna di Ferrara. Entrambe le sorgenti impiegate sono in grado di produrre radiazioni gamma con dosaggio regolabile in funzione del tempo di esposizione.

Dopo alcune prove preliminari volte a confermare l'efficacia sterilizzante delle sorgenti radianti degli impianti di irraggiamento di Roma e di Ferrara, si sono eseguite prove di irraggiamento presso l'Ospedale S. Anna di Ferrara con l'impiego di Cs137 su pupe mantenute in acqua. La scelta di tale dispositivo è stata dettata dalla convenienza di disporre di un impianto vicino alle zone di allevamento e di lancio dei maschi allevati.

Le pupe utilizzate in queste prove si sono ottenute da allevamenti larvali condotti in vasche di plastica (41x31x11 cm) con densità di 4.000 larve/3lt e dieta standard (2,8 mg/larva di biscotti per gatti *Friskies Adult*® + 0,5 mg/larva di lievito di birra + 0,2 mg/larva di *Tetramin*®). Le pupe sono state sessate con setacci a maglie quadrate da 1.400 µm (*Giuliani*®) raccogliendo gli esemplari che nei 4-5 minuti di permanenza in acqua a 35°C erano dimensionalmente in grado di attraversare le maglie del setaccio posto loro da ostacolo nella risalita verso la superficie dell'acqua per respirare (Medici et al. 2000). Il materiale da irraggiare è stato quindi trasportato presso il Centro di Fisica Sanitaria dell'Ospedale S. Anna di Ferrara (Direttore Dott. Candini) e disposto equamente in acqua in capsule Petri (Ø 12cm) impilate all'interno dell'apposito contenitore di irraggiamento. Sono state realizzate prove con dosi di irraggiamento di 40, 78, 80 e 85 Gy.

In laboratorio 50 pupe irraggiate sono state trasferite in vaschette di plastica e posizionate in gabbia (teca di plexiglas 30 x 30 x 30 cm) insieme a 50 femmine vergini (Tab 8.6 Fig.8.2).

Si nota l'evidente non linearità nella risposta in termini di sterilità indotta nel range di dosi studiate, che è quello adeguato per la definizione della dose più conveniente. Questa risposta non lineare si potrebbe spiegare col fatto che le pupe irraggiate erano di età variabile e non omogenea. Come riportato anche da Wijeyaratne (1977) le pupe più vecchie mostrano una minore mortalità e una maggiore sensibilità alle radiazioni rispetto a quelle più giovani.

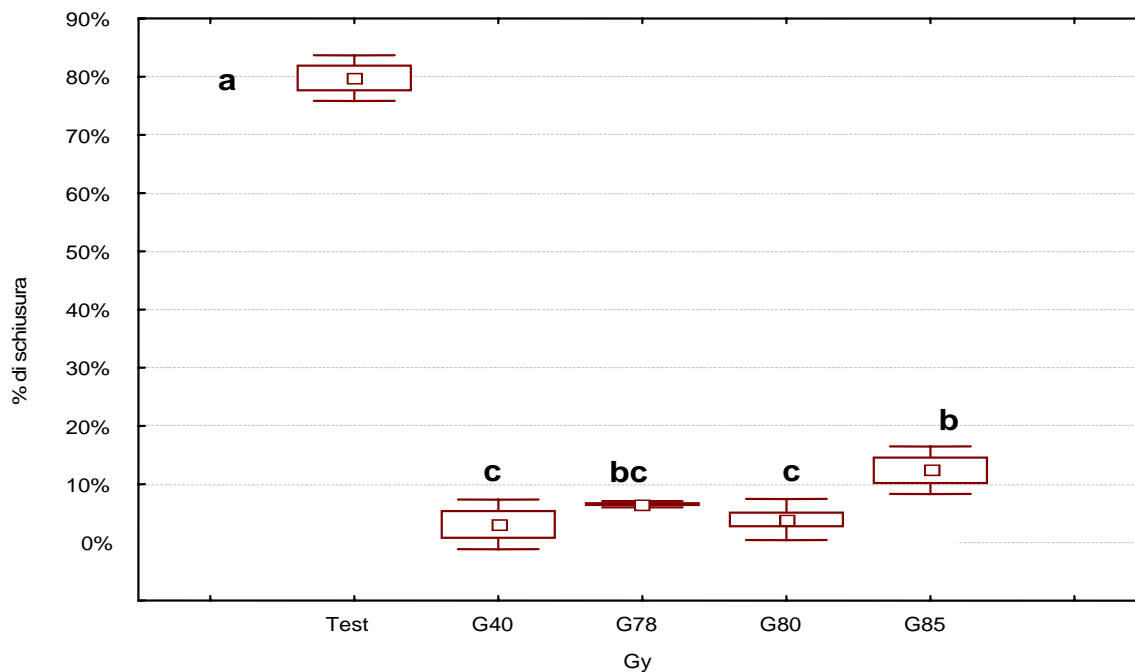
Tab.8.6 - Prove di irraggiamento su pupe maschili di *Aedes albopictus*

50 maschi irraggiati (Gy) + 50 femmine vergini

Gy	n° repliche	uova deposte	larve	% schiusura
0	3	3.567	2.826	79,8 ± 3,9
40	3	4.449	211	3,1 ± 4,3
78	3	2.361	147	6,6 ± 0,5
80	7	7.360	302	3,9 ± 3,5
85	3	4.799	628	12,4 ± 4,1

Fig.8.2 - Analisi statistica delle percentuali di schiusura delle uova

Lettere diverse indicano differenze significative (Test di Newman – Keuls)



Sono state inoltre eseguite prove sottoponendo le pupe di diversa età (età misurata in ore dall'impupamento) a dosi di 85 Gy per verificare mortalità ed efficacia sterilizzante in funzione dello stato di maturazione del campione irraggiato. In laboratorio campioni di 50 pupe irraggiate alle diverse età sono stati trasferiti in vaschette di plastica e posizionati in gabbia (teca di plexiglas 30 x 30 x 30 cm) assieme a 50 femmine vergini. L'analisi dei livelli di sterilità ottenuti è avvenuta attraverso l'osservazione delle percentuali di schiusura delle uova deposte dalle femmine posizionate nelle gabbie con i diversi maschi.

I risultati ottenuti evidenziano come l'età delle pupe influisca sia sulla loro mortalità a seguito dell'irraggiamento che sull'efficacia sterilizzante dell'irraggiamento (Tab.8.7 e Tab.8.8).

La mortalità dei maschi risulta molto elevata fino alle 14 h di età mentre non sembrano esserci differenze consistenti oltre le 14 h (Tab.8.7).

Tab.8.7 - Mortalità a seguito dell'irraggiamento di pupe maschili di diversa età (85 Gy)

	<i>età</i>	<i>n° irraggiate</i>	<i>n° morte</i>	<i>adulti morti</i>	<i>Totale</i>	<i>% mortalità</i>
Pupe Giovani	2-7h	300	151	105	256	85%
	2-14 h	200	72	69	141	71%
Pupe Medie	>14 h	200	6	8	14	7%
	7-22h	300	7	29	36	12%
Pupe Vecchie	>22h	300	4	19	23	8%

Per quanto riguarda la fertilità residua, utilizzando la stessa dose di 85 Gy, si osserva che le pupe giovani conservano un certo grado di fertilità, dove le pupe più mature sono sterili al 100% (Tab.8.8).

Tab.8.8 - Fertilità (85 Gy)

Replica (1) 50 maschi irraggiati (85 Gy) + 50 femmine vergini

	<i>pupe giovani (2-14 h)</i>			<i>pupe medie (>14 h)</i>		
	uova	larve	% schiusura	uova	larve	% schiusura
1° pasto sangue	1116	13	1,2	589	0	0
2° pasto sangue	1426	108	7,6	234	0	0
3° pasto sangue	729	52	7,1	299	0	0
	5,3 ± 3,6			0,0 ± 0,0		

Replica (2) 50 maschi irraggiati (85 Gy) + 50 femmine vergini

	<i>pupe giovani (2-7h)</i>			<i>pupe medie (7-22h)</i>			<i>pupe vecchie (>22h)</i>		
	uova	larve	% schiusura	uova	larve	% schiusura	uova	larve	% schiusura
1° pasto sangue	317	57	18,0	1025	0	0	1576	0	0
2° pasto sangue	155	1	0,6	941	0	0	919	1	0,001088
3° pasto sangue	44	2	4,5	168	0	0	520	0	0
	7,7 ± 9,1			0,0 ± 0,0			0,0 ± 0,0		

Occorre quindi fare molta attenzione all'età delle pupe da irraggiare affinché gli effetti radianti determinino un efficace effetto sterilizzante senza influire eccessivamente sulla perdita di fitness del campione irraggiato. Ulteriori prove di laboratorio sono in programma per valutare la possibilità di irraggiare i maschi di *Ae.albopictus* allo stadio adulto.

Recenti prove di sterilizzazione condotte su diversi stadi di sviluppo in *Anopheles stephensi*, hanno infatti dimostrato come l'irraggiamento su esemplari adulti garantisca il mantenimento della competitività del campione trattato rispetto agli adulti irradiati allo stadio pupale (Andreasen e Curtis, 2005).

Risulta anche necessario programmare un nuovo ciclo di prove di irraggiamento su pupe di età superiore alle 14 h al fine di individuare con esattezza la giusta dose sterilizzante.

Prove di lancio 2005

Dopo aver realizzato una efficace struttura di allevamento con produttività potenziale pari a 100.000 pupe per settimana e dopo aver convalidato l'attività sterilizzante della sorgente al Cesio 137, si è proceduto alle prove di lancio dei maschi sterili.

L'area urbana di sperimentazione è stata scelta sulla base dei requisiti tecnici presentati dalla località. Santamonica risulta infatti un centro abitato infestato dalla Zanzara Tigre con sufficiente isolamento geografico dalle vicine aree urbane infestate (Fig.8.3) e adeguatamente esteso (45 ha) da garantire il posizionamento di 20 stazioni di lancio distanti tra loro in media 150 m. All'interno dell'area di lancio sono state inoltre posizionate 40 stazioni di rilevamento costituite da ovitrappole standard CAA. L'area urbana di Rimini (2.200 ha) è stata scelta come area testimone della prova utilizzando le catture delle 100 ovitrappole normalmente impiegate per il monitoraggio della diffusione dell'insetto come valori di riferimento della dinamica della popolazione locale. Ulteriori 20 stazioni di rilevamento definite SIT+ sono state posizionate esternamente all'area di lancio a partire dal 18 Agosto (Fig. 8.4).

Le pupe maschili sterilizzate sono state rilasciate in campo con cadenza settimanale nel periodo compreso tra il 14 Giugno e il 20 Settembre 2005, usando contenitori plastici posizionati in stazioni di lancio fisse in zone ombreggiate. L'andamento delle dosi di rilascio settimanale in campo è mostrato in figura 8.5.

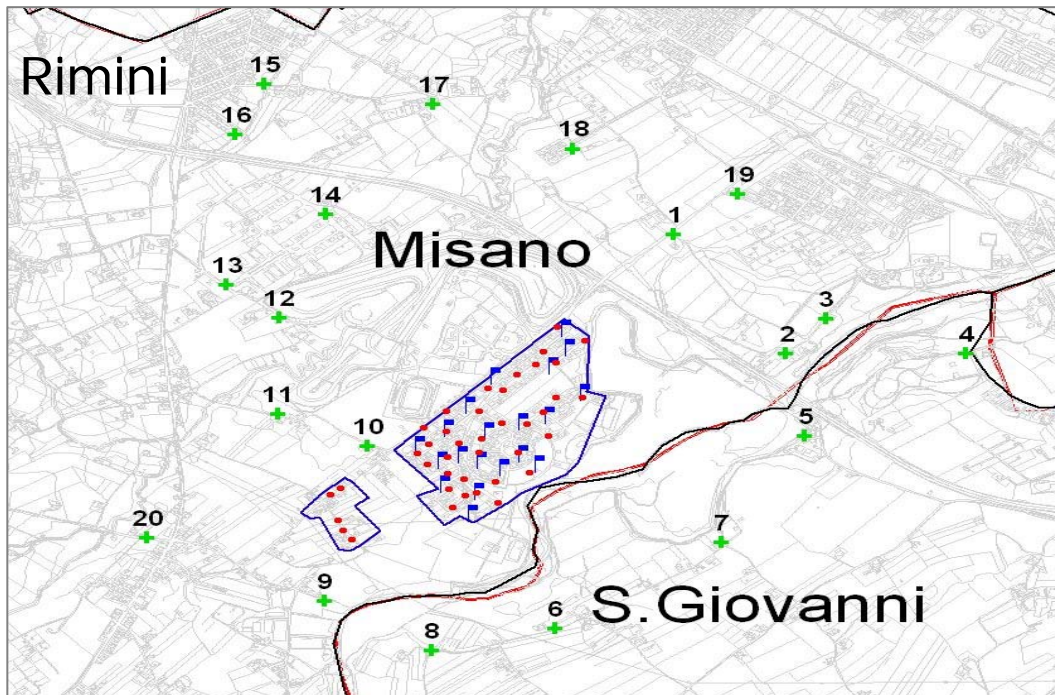
Nel corso della sperimentazione sono state lanciate in campo 633.000 pupe pari a 525.000 maschi adulti effettivi. La media di rilascio settimanale sul periodo di prova è risultato pari a 900 maschi/ha con una presenza media di femmine indesiderate rilasciate pari a 1,2%.

Il monitoraggio delle uova in campo è stato attivato 2 settimane prima dell'inizio dei lanci e prolungato di 2 settimane dopo l'ultimo rilascio.

Fig.8.3 - Vista dell'area di prova di Santamonica



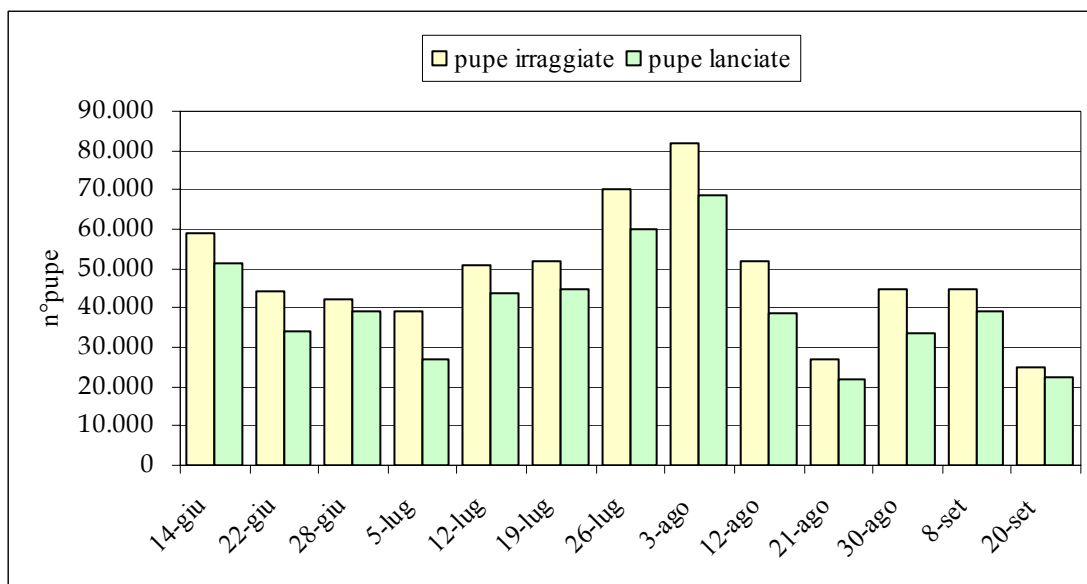
Fig.8.4 - Vista dell'area di prova di Santamonica con indicazione delle stazioni di lancio e di rilevamento
 Santamonica - AREA SIT (45 ha): (•) 40 stazioni di rilevamento (■) 20 stazioni di lancio
 Area SIT + : (+) 20 stazioni di rilevamento



Nel periodo di rilascio dei maschi sterili sono continuate con regolarità le attività di controllo e di lotta larvicida e di rimozione dei focolai di sviluppo nelle due aree di prova. La valutazione del grado di efficacia del metodo è stata condotta in continuo, parallelamente al lancio del materiale, verificando in laboratorio i livelli di fertilità delle uova raccolte settimanalmente in campo dall'area di lancio e dall'area testimone attraverso l'analisi del tasso di schiusura delle uova raccolte. Dai dati raccolti si è potuto osservare come il numero di uova raccolte nell'area di rilascio abbia mostrato la stessa dinamica osservabile nell'area di controllo durante tutta la stagione (Fig.8.6).

L'analisi statistica della fertilità delle uova raccolte nell'area di rilascio mostra invece una diminuzione significativa (-16,6%) in rapporto alla fertilità delle uova deposte nell'area testimone di Rimini (Fig.8.7). L'analisi ANOVA evidenzia una riduzione significativa ($f=8,25$ e $p<0,01$) tra testimone e area SIT nella percentuale di schiusura delle uova (Tab. 8.9).

Fig.8.5 – Dimensioni dei lanci 2005



Tab. 8.9 Analisi statistica fertilità delle uova Area SIT vs Area Testimone

<i>Tesi</i>	<i>N</i>	<i>% schiusura uova</i>
SIT	3	52,79 ± 29,04
TEST	15	64,98 ± 32,14

ANOVA a blocchi con trasformazione angolare delle percentuali
effetti significativi per $p < 0,05$

	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
tesi	4,781523	1	4,781523	8,251331	0,011625
data*tesi	8,692276	15	0,579485		

Fig.8.6 - Andamento del numero di uova deposte - Area SIT vs Area Testimone (Rimini)

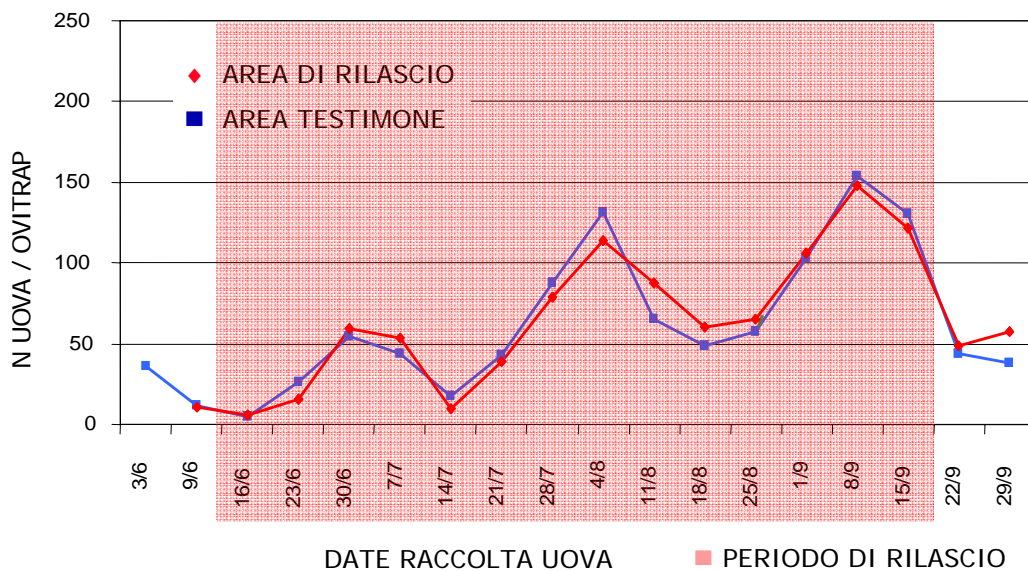
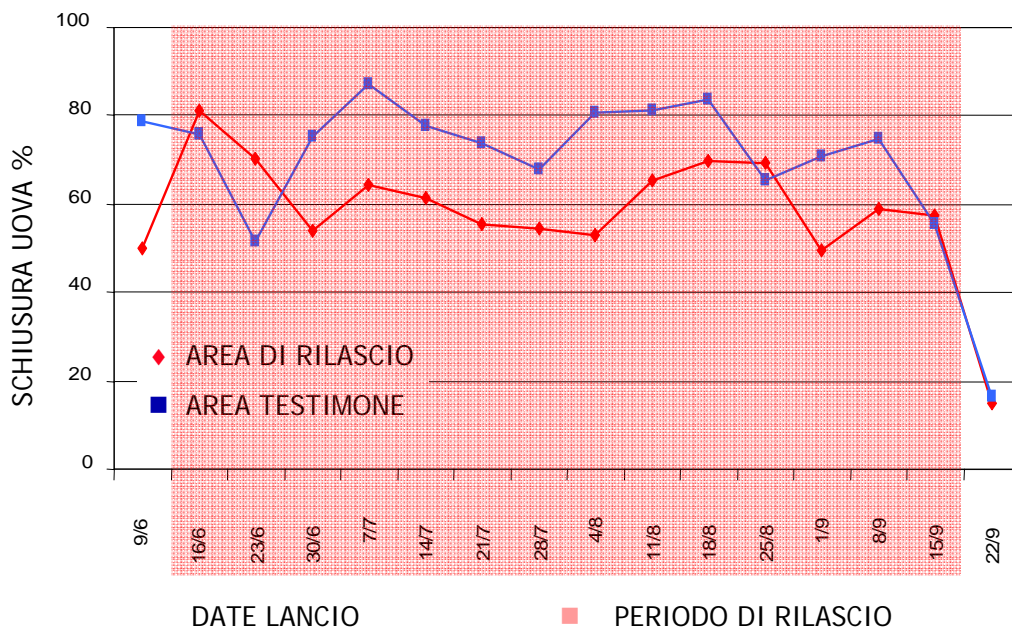


Fig.8.7 - Andamento della percentuale di schiusura delle uova deposte - Area SIT vs Area Testimone (Rimini)



Prove di competizione in serra

Su pupe irraggiate alla dose di 85 Gy (età pupe >22h) si sono realizzate prove di competizione introducendo in una serra (10 x 5,8 x 2,8 m) realizzata con rete ombreggiante (*Arrigoni scirocco black*®) 200 maschi sterili (85Gy), 200 maschi fertili e 160 femmine vergini (Fig. 8.8). I maschi avevano la stessa età e le femmine erano prelevate dallo stesso ceppo di allevamento dei maschi. Le prove sono state eseguite dal 2 al 19 Settembre 2005 in località Ronchi, Crevalcore (Bologna). Nella serra sono stati posizionati tamponi di carta assorbente imbevuti di soluzione zuccherina al 10% per l'alimentazione degli adulti e, alle femmine, è stato offerto un pasto di sangue su uomo ogni giorno. Le analisi di competizione sono state realizzate osservando i livelli di fertilità delle uova raccolte con 3 ovitrappole.

L'analisi dei primi dati raccolti mostra una scarsa attività competitiva dei maschi trattati. Al tempo stesso risulta molto scarsa la quota di uova deposte da ogni femmina che ha prelevato un pasto di sangue durante la prova. Questa prova preliminare condotta all'aperto necessita di ulteriori approfondimenti in quanto la mortalità generale degli adulti appare troppo elevata forse a causa di avverse condizioni climatiche in cui si sono svolte le prove.

In Tab.8.10 vengono riportati i dati relativi alle due repliche condotte per questa prova.

Fig.8.8– Tunnel impiegato per la prova di competizione



Tab.8.10 - Competizione in tunnel

200 maschi sterili 85 Gy + 200 maschi fertili + 160 femmine vergini

Replica (1) Data introduzione adulti in tunnel 02/09/2005

<i>femmine con pasto</i>	<i>data di raccolta</i>	<i>uova deposte</i>	<i>uova per femmina</i>	<i>larve</i>	<i>% schiusura</i>
82 *	12/09/2005	435	5,3	223	51,2

* somma delle femmine con pasto dal 05/09 al 08/09 (05/09 [28] 06/09 [38] 07/09 [15] 08/09 [1])

Replica (2) Data introduzione adulti in tunnel 10/09/2005

<i>femmine con pasto</i>	<i>data di raccolta</i>	<i>uova deposte</i>	<i>uova per femmina</i>	<i>larve</i>	<i>% schiusura</i>
67 *	19/09/2005	834	12,4	582	69,7

* somma delle femmine con pasto dal 14/09 al 16/09 (14/09 [62] 15/09 [4] 16/09 [1])

Prove tombino 2005

Una femmina vergine di zanzara riceve nel corso dell'unico accoppiamento con il maschio una carica spermatica che le servirà alla fecondazione di tutte le uova prodotte. Le femmine vergini devono quindi poter incontrarsi liberamente coi maschi sterili. La domanda che richiede una verifica specifica da questo punto di vista è: le femmine che si sviluppano nella tombinatura stradale si accoppiano prima di uscire dal manufatto?

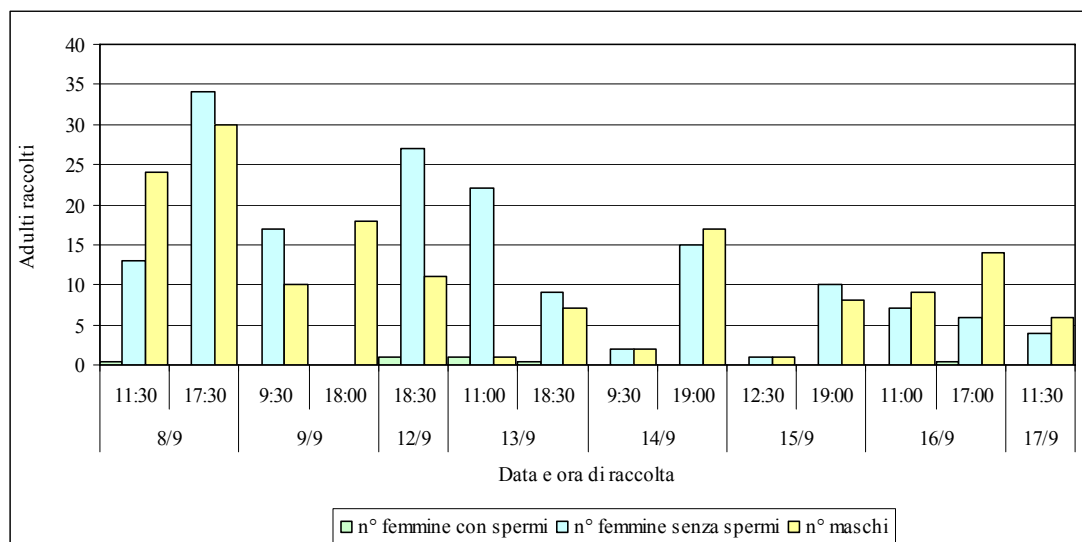
Le ultime prove realizzate in campo nella stagione 2005 hanno perciò interessato lo studio dello stato di fecondazione delle femmine di *Ae. albopictus* all'interno dei tombini stradali, uno dei più importanti focolai di sviluppo per questa specie in Italia.

Per la realizzazione della prova si è proceduto a coprire un tombino stradale infestato da larve di Zanzara Tigre con una rete a maglie fitte (Fig. 8.9). Dal tombino coperto si sono prelevati giornalmente tutti gli adulti sfarfallati attraverso un aspiratore a batteria. Sulle femmine prelevate si è testato lo stato di fecondazione attraverso la verifica della presenza di spermatozoi all'interno delle spermatociti. Dai dati riportati in figura 8.10 risulta molto elevata la percentuale di femmine che non ha subito un accoppiamento efficace all'interno del tombino (97,4%). Questo dato viene confermato da prove condotte in laboratorio che confermano la completa recettività delle femmine all'accoppiamento solo per esemplari di età superiore alle 30 - 45 ore.

Fig. 8.9 Copertura del tombino stradale



Fig.8.10 - Prova tombino: analisi delle femmine fuoriuscite



Considerazioni finali

Nel corso della sperimentazione siamo riusciti a potenziare l'allevamento massale realizzando una efficace struttura pilota con produttività potenziale pari a 100.000 pupe maschio per settimana.

Le vaschette da 4.000 larve in 3 litri d'acqua, attualmente in uso sembrano costituire un buon compromesso tra le esigenze di spazio e la maneggevolezza.

La dieta larvale standard è stata migliorata con l'integrazione di nuovi componenti. E' necessario riverificare i dosaggi/larva che a questo punto potrebbero essere in eccesso.

Il sistema di arieggiamento delle vasche di allevamento larvale risulta inadatto perché poco regolabile e soggetto ad eccessive fluttuazioni di volume d'aria nel tempo e tra le vaschette.

Il sistema di separazione dei sessi adottato permette il recupero di una quota del 40-50% dei maschi totali presenti all'atto del setacciamento con una presenza di femmine attorno all'1%. Affinando la tecnica è ipotizzabile di riuscire ad ottenere un sensibile margine di miglioramento in questa fase.

Operando in una realtà dove *Ae.albopictus* non svolge un ruolo vettore il rilascio di una piccola quota di femmine sterili insieme ai maschi sterili non dovrebbe tuttavia costituire ostacolo rilevante. La tecnica di sterilizzazione adottata attraverso la somministrazione di radiazioni gamma è risultata efficace senza evidenti differenze tra le due sorgenti radianti testate.

Emerge in modo evidente l'importanza dell'età delle pupe in termini di sensibilità all'irraggiamento e di sopravvivenza. Occorrerà approfondire accuratamente questo aspetto al fine di valutare i margini di miglioramento in termini di riduzione della dose di raggi gamma da somministrare per ottenere piena sterilità e di maggiore competitività dei maschi sterili così ottenibili.

Nel corso della stagione 2005 l'allevamento ha subito un forte calo di rendimento imputabile a una probabile causa infettiva tuttora in esame con la collaborazione di centri specializzati esteri.

In tabella 8.11 è possibile confrontare in maniera schematica i dati medi relativi agli ultimi due anni di esperienze svolte.

Tab 8.11 Dati sperimentazione 2004-2005

	2004	2005
rendimento allevamento	4,90%	13,00%
mortalità fase irrag. - lancio	12,10%	17,10%
% maschi lanciati	97,40%	98,80%
dose maschi/ha	625	900
stazioni di lancio	distanza (m)	28±3,2 108±4,4
	Area (N ovitrap/ha)	4/ha 0,44/ha
riduzione fertilità	-14%	-16,60%
riduzione n. uova	-22%	-1,40%

Il rendimento dell'allevamento risente ancora molto dell'elevata mortalità larvale che si riscontra in modo disomogeneo tra le vaschette di allevamento. Si tratta di individuarne la/e causa/e e rimuoverla/e per poter raggiungere i livelli di produttività potenziali.

La mortalità nelle fasi di irraggiamento-lancio è principalmente imputabile all'irraggiamento, seppure non distinguibile in termini numerici per esigenze pratiche di sperimentazione. Nel 2005 l'elevata mortalità registrata ha risentito dell'irraggiamento di pupe più giovani rispetto al 2004 a

seguito del trasferimento da Roma a Ferrara della fase di irraggiamento, con tempi di trasporto del materiale decisamente più contenuti.

La % di maschi lanciati sul totale delle pupe lanciate è sensibilmente migliorata rispetto al 2004 a seguito dell'affinamento della tecnica. Riteniamo ancora ottenibile un ulteriore margine di miglioramento.

Per quanto riguarda le prove in campo è da sottolineare che mentre nel 2004 i lanci erano stati condotti in un'area urbana senza alcun isolamento dall'area circostante, nel 2005 la località scelta era in qualche modo isolata da una fascia di terreno agricolo e naturale che costituiva una barriera seppure parziale all'immigrazione di femmine dall'esterno.

La dose di lancio è stata aumentata nel 2005 rispetto al 2004 e contemporaneamente si è ridotta la densità delle stazioni di lancio in modo da porsi in una condizione operativamente più conveniente.

I due parametri di valutazione dell'efficacia dei maschi sterili lanciati mostrano una riduzione di fertilità sostanzialmente simile nei due anni, mentre attendevamo una sterilità più elevata nel 2005. Può aver influito negativamente la qualità dei maschi lanciati a seguito del loro stato fisiologico (patologia?) e dell'irraggiamento su una buona quota di pupe maschili giovani.

L'altro parametro, la quantità di uova deposte, legato alla sterilità indotta nella popolazione e quindi all'effetto sulla quota di prole prodotta, è evidentemente influenzato da vari parametri ambientali e non in linea col dato di sterilità indotta osservata.

Allo stato delle cose è evidente la necessità di migliorare la qualità dei maschi sterili prodotti.

Vi sono diverse possibilità di lavorare in questo senso: irraggiare gli adulti anziché le pupe, allevare gli adulti in strutture di più ampie dimensioni anziché in gabbia in modo da evitare la deriva genetica che ne consegue, mantenere diverse linee omozigoti in laboratorio da incrociare nell'ultima generazione prima del lancio in modo da ripristinare eterozigosi.

Ringraziamenti

Si ringrazia il Dr.Candini e la sua equipe del Centro di Fisica Sanitaria dell'Ospedale S.Anna di Ferrara per la preziosa collaborazione nella fase di irraggiamento delle pupe.

Bibliografia

Andreasen M.H., C.F.Curtis. 2005. *Optimal life stage for radiation sterilization of Anopheles males and their fitness for release*. Med. Vet. Entomol. 19:238-244

Bellini R.. 2005. *Applicazione della tecnica del maschio sterile nella lotta ad Aedes albopictus*. Tesi di Dottorato Entomologia Agraria, DiSTA - Università degli Studi di Bologna, 82 pag.

Carter S.W.. 1989. *A review of the use of synthetic pyrethroids in public health and vector pest control*. Pestic. Sci. 27: 361-374

Dalla Pozza G.L., R.Romi, C.Severini. 1994. *Source and spread of Aedes albopictus in the Veneto Region of Italy*. J. Am. Mosq. Assoc. 10(4): 589-592

Medici A., M.Carrieri. E-J.Scholte, R.Bellini. 2000. *Studies aimed to set-up a sterilization technique program against Aedes albopictus Skuse*. 13th Ann. Meet. Soc. Vector Ecol., Europ. Reg., Belek, Turkey, Sept. 24-29

Rai K.S.. 1996. *The biology of disease vectors*. Univ. Press of Colorado, 632 pp.

- Reisen W.K., R.K.Sakai, R.H.Baker, H.R.Rathor, K.Raana, K.Azra, S.Niaz. 1980. *Field competitiveness of Culex tritaeniorhynchus males carrying a complex chromosomal aberration: a second experiment*. J. Econ. Entomol. 97: 1547-1553
- Reisen W.K., M.M.Milby, S.M.Asman, M.E.Bock, R.P.Meyer, P.T.McDonald, W.C.Reeves, 1982. *Attempted suppression of a semi-isolated Culex tarsalis population by the release of irradiated males: a second experiment using males from a recently colonized strain*. Mosq. News 42: 565-575
- Reiter P., D.Sprengen. 1987. *The used tire trade: a mechanism for the world-wide dispersal of container breeding mosquitoes*. Mosq. News 44(3): 385-395
- Romi R.. 1994. *Aedes albopictus in Italia: problemi sanitari, strategie di controllo e aggiornamento della distribuzione al 30 settembre 1994*. Notiziario I.S.S. 7 (10): 7-11
- Rutledge L.C., R.A.Ward, D.J.Gould. 1964. *Studies on the feeding response of mosquitoes to nutritive solutions in a new membrane feeder*. Mosq. News 24: 407-419
- Sabattini A., V.Raineri, G.Trovato, M.Coluzzi. 1990. *Aedes albopictus in Italia e possibile diffusione della specie nell'area mediterranea*. Parassitologia 32: 301-304
- Service M.W..1983. *Biological control of mosquitoes-has it a future?* Mosq. News 43: 113-120
- Sharma V.P.. 1985. *Integrated Mosquito Control Methodologies*, Vol. 2, Academic Press London, Chapt. 5.
- Shroyer D.A.. 1986. *Aedes albopictus and arboviruses: a concise review of the literature*. J. Am. Mosq. Control Assoc. 2(4): 424-428
- Timmermann S.E., H.Briegel. 1999. *Larval growth and biosynthesis of reserves in mosquitoes*. J. Insect Physiol. 45: 461-470
- Vazeille-Falcoz M., J.Adhami, L.Mousson, F.Rodhain. 1999. *Aedes albopictus from Albania: a potential vector of dengue viruses*. J. Am. Mosq. Control Assoc.15(4): 475-478
- Wijeyaratne P.M, D.E.Weidhaas, B.J.Smittle, M.D.Boston. 1977. *Sterilization of male Culex quinquefasciatus evaluation of five insect chemosterilants and gamma irradiation*. Mosq. News 37: 1-5