

***Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) a Roma: analisi sperimentale di parametri rilevanti in strategie di controllo**

M. Pombi, C. Costantini, A. della Torre

Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica, Sezione di Parassitologia, Università degli Studi di Roma "La Sapienza", Piazzale Aldo Moro 5, 00185 Roma, Italy.

Abstract. Since 1997, *Aedes albopictus* has colonised and then rapidly invaded the city of Rome (Italy) and its peripheral areas. Presently, the control of this mosquito in Italy relies mainly on larvicidal treatment of street storm sewer catch basins with the organophosphate temephos. We have therefore obtained baseline data on the susceptibility to temephos of the Roman *Ae. albopictus* population by laboratory bioassays on F1 fourth-instar larvae following standard WHO protocols. Estimated lethal concentrations were 0.014 mg/l (LC₅₀) and 0.022 mg/l (LC₉₀) indicating a lack of resistance to this compound. The persistence of temephos in sewer catch basins was evaluated by follow-up of catch basins treated with a dose of 1.5 mg of active ingredient. Mosquito larvae were recovered in 10% and 50% of the treated basins at 9 and 18 days post-treatment, respectively. In order to understand the relative contribution of this larval habitat to adult populations, we conducted a survey in the Zoo of Rome to estimate the larval density of mosquitoes breeding in sewer catch basins. A complete census of a 16.5 ha area mapped 243 catch basins, but only 25 (10.3%) contained water; of the latter 8 (32.0%) hosted mosquito larvae. All positive catch basins contained larvae of *Culex pipiens*, which were associated with *Culiseta longiareolata* and/or *Ae. albopictus* in 6 and 3 cases, respectively. A longitudinal survey of one catch basin over 4 months showed that the mean larval density of *Ae. albopictus* was markedly lower than that of *Cx pipiens* and *Cs. longiareolata*, ranging between 0 and 1.3 larvae/dip as compared to 0-33.2 and 0-22.7 larvae/dip, respectively. However, adult densities of *Ae. albopictus* in this area estimated during the same period with 20 ovitraps showed consistently high values (proportion of positive ovitraps around 100%). These preliminary observations suggest that whenever alternative larval biotopes other than sewer catch basins are widely available, they might be more productive and/or preferred substrates to catch basins for *Ae. albopictus* breeding.

Key words: *Aedes albopictus*, temephos susceptibility, Italy.

Aedes albopictus, nota anche come "zanzara tigre", è un Culicidae che è riuscito a colonizzare, partendo dal suo areale di origine asiatico, una vasta area geografica, dalle zone tropicali a quelle temperate, adattandosi alle più disparate condizioni ambientali (Hawley, 1988). Attualmente questa specie è presente in tutti i continenti ed è in molti casi integrata così stabilmente nei nuovi habitat da renderne difficile l'eradicazione (Romi, 2001). Il suo coinvolgimento nella trasmissione della dengue in aree tropicali ed il suo potenziale ruolo nella trasmissione di altre arbovirosi e di filariasi, rendono la sua presenza un problema di sanità pubblica esacerbato dal fastidio causato dal suo comportamento di puntura, aggressivo e persistente, e dalle reazioni allergiche sovente violente causate dalle sue punture (Mitchell, 1991, 1995; Cancrini *et al.*, 1995; Lai *et al.*, 2001).

Ae. albopictus è presente in Italia dal 1990 (Sabatini *et al.*, 1990), dove ha colonizzato nove regioni in poco più di dieci anni. Questa rapida espansione del suo areale di distribuzione ha coinvolto anche la città di Roma, in cui le prime segnalazioni

sono relative al 1997 (Romi, 2001). Qui, in quattro anni, *Ae. albopictus* ha occupato tutti i Municipi e molti Comuni della Provincia, con un costante processo d'espansione che non accenna a diminuire (Di Luca *et al.*, 2001). La lotta contro *Ae. albopictus* nel Comune di Roma fin dal 1999 si esplica prevalentemente tramite trattamenti anti-larvali nelle caditoie stradali di aree pubbliche con insetticidi organofosforici quali il temephos, secondo le linee guida tracciate dall'Istituto Superiore di Sanità (Di Luca *et al.*, 2000).

Date le scarse conoscenze sulla biologia delle popolazioni di *Ae. albopictus* dell'area mediterranea, abbiamo ritenuto importante valutare alcuni parametri di rilievo nella pianificazione ed implementazione degli interventi di controllo anti-larvale. A tale scopo, abbiamo anzitutto valutato in laboratorio il livello di sensibilità al temephos della popolazione romana di *Ae. albopictus*, per verificare la presenza di eventuali fenomeni di resistenza e per stabilire il livello di sensibilità di base a questo principio attivo al fine di monitorarne eventuali cambiamenti nel tempo. Inoltre, abbiamo calcolato la persistenza dell'effetto larvicida del temephos nelle caditoie stradali, che rappresentano un focolaio-bersaglio per il quale esistono scarse indicazioni che permettano di pianificare la frequenza dei trattamenti. Infine, abbiamo raccolto dati preliminari sull'importanza relativa delle caditoie stradali quali focolai di

sviluppo larvale di *Ae. albopictus* e valutato la dinamica di popolazione di questa specie in relazione a quella di altre specie di Culicidi presenti in questo tipo di habitat larvale.

Materiali e metodi

Il lavoro sperimentale di campo è stato condotto nel Bioparco di Roma (Fig. 1), già Giardino Zoologico. Questa zona, situata nel II Municipio, è caratterizzata da elevati livelli di infestazione (Di Luca *et al.*, 2001). Qui è stato condotto uno studio specifico sul grado di persistenza dei trattamenti con temephos nelle caditoie stradali abbinato ad un monitoraggio con ovitrappole al fine di ottenere dati sulla presenza e densità della popolazione adulta di *Ae. albopictus* durante l'intero periodo di studio. I test di laboratorio della sensibilità al temephos sono stati eseguiti negli insettari della Sezione di Parassitologia del Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica dell'Università di Roma "La Sapienza".

Sensibilità al temephos

La sensibilità al temephos è stata valutata su larve F₁ ottenute da una colonia stabilita nel settembre 2000

a partire da adulti raccolti nel Bioparco tramite catture su uomo. Alle femmine di *Ae. albopictus* così raccolte è stata messa a disposizione una cavia su cui compiere il pasto di sangue e un contenitore cilindrico (diametro 6 cm) riempito con circa 80 ml di acqua ed interamente rivestito da strisce di carta assorbente come supporto per la deposizione delle uova. Le strisce di carta sulle quali erano deposte le uova sono state successivamente immerse all'interno di bacine. Le larve sono state allevate nelle medesime bacine e nutrite con croccantini per gatti. Le condizioni ambientali durante l'allevamento e gli esperimenti sono state: temperatura 25-26°C, umidità relativa 50-70%, fotofase 14 ore.

Il protocollo dei biosaggi è stato sviluppato sulla base delle linee guida dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO, 1981). Larve di III-IV stadio sono state raccolte e separate in gruppi di 20 individui in tubi Falcon da 50 ml contenenti 30 ml di acqua distillata. Successivamente, ogni gruppo di larve è stato trasferito in un bicchiere di plastica trasparente contenente 170 ml di temephos in soluzione a concentrazioni diverse; infine, si è proceduto ad un delicato mescolamento per 30 secondi con una bacchetta di vetro. Il controllo (20 larve in 200 ml di acqua distillata) è stato preparato con la medesi-

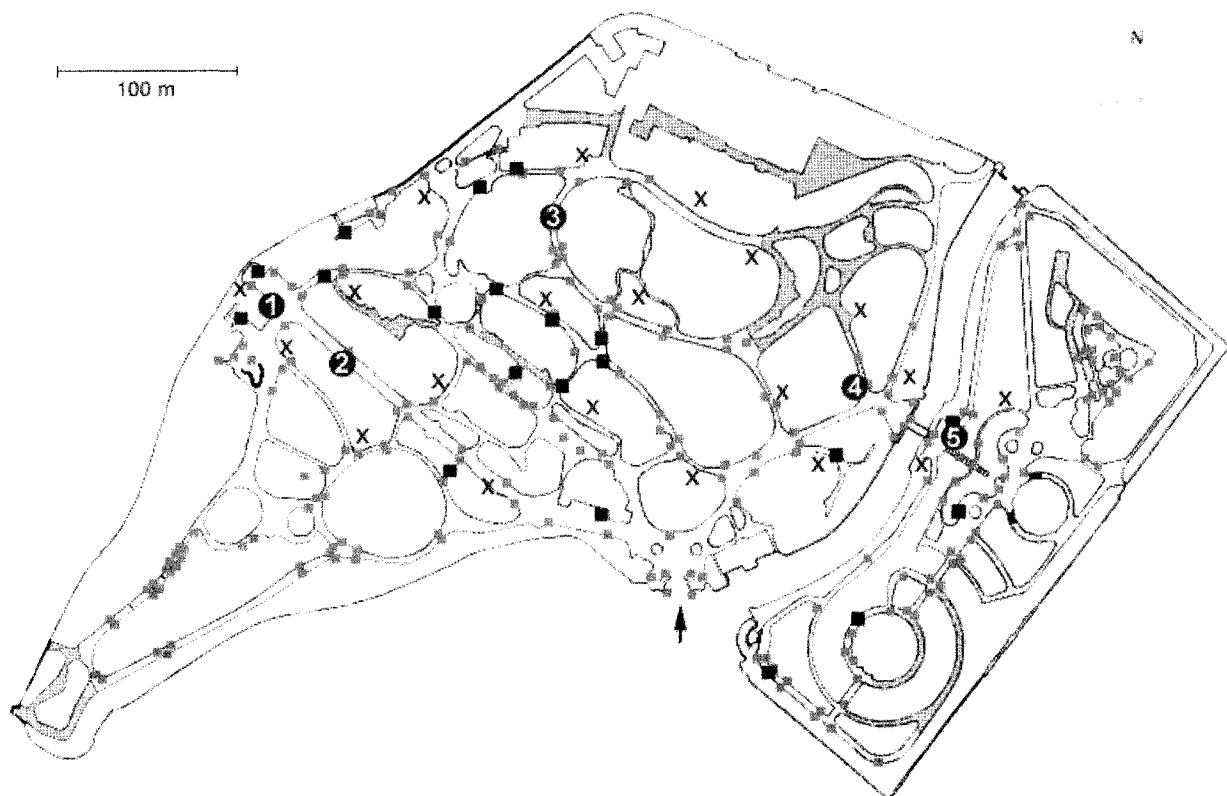


Fig. 1. Carta del Bioparco che mostra la distribuzione delle ovitrappole e delle caditoie censite. In grigio sono evidenziate le aree non accessibili a causa di lavori di ristrutturazione. Le 'x' rappresentano le ovitrappole. I quadrati grigi rappresentano le caditoie 'negative', i quadrati neri rappresentano le caditoie 'attive' o 'positive' ed i cerchi neri numerati rappresentano le caditoie positive utilizzate per la valutazione della persistenza dell'effetto larvicida del temephos. Le caditoie 1, 2 e 4 sono state trattate con temephos, le caditoie 3 e 5 sono state utilizzate come controlli positivi.

ma procedura. Per ciascun test sono state sperimentate in parallelo ad un controllo 4-6 concentrazioni di temephos.

La mortalità larvale è stata verificata dopo 24 e 48 ore dall'esposizione. Le larve sono state classificate come (a) 'vive', larve che hanno presentato un normale comportamento ed una normale risposta a disturbi esterni; (b) 'moribonde', larve con un atteggiamento torpido o con spasmi, non reattive a stimoli esterni ed incapaci di risalire in superficie o di scendere sul fondo del contenitore; (c) 'morte', larve che non hanno risposto per un periodo di 10 minuti a nessuno stimolo visivo o meccanico, neanche se toccate sulla zona cervicale o del sifone. Per il calcolo della mortalità le larve 'moribonde' dopo 48 ore sono state sommate alle larve morte. I test non hanno mai dato una mortalità del gruppo di controllo superiore al 5%.

Le concentrazioni letali mediana (CL_{50}) e al 90% (CL_{90}) sono state stimate tramite regressione logistica della curva della mortalità in risposta alla dose, con il software di analisi statistica GLIM® versione 3.77 (Payne, 1987). A tale scopo, la proporzione di larve morte p ha subito una trasformazione logit, $\ln [p/(1-p)]$, e si è assunta una struttura binomiale degli errori. I limiti fiduciali della CL_{50} sono stati calcolati applicando il teorema di Fieller (Collett, 1991).

Monitoraggio della popolazione imarginale

La presenza e la densità di *Ae. albopictus* nel Bioparco nel periodo settembre-dicembre 2000 sono state valutate tramite 20 ovitrappele (Service, 1993; Di Luca et al., 2000) disposte uniformemente nell'area di studio (Fig. 1). Le ovitrappele sono state controllate settimanalmente e i dati raccolti sono stati elaborati calcolando la percentuale di ovitrappele positive (= con almeno un uovo di *Ae. albopictus*) sul totale di ovitrappele, e la media geometrica del numero di uova per ovitrappele positiva.

Censimento delle caditoie e dinamica di popolazione larvale

Le attività sperimentali e di monitoraggio sono state precedute da un censimento delle caditoie nell'area di studio (circa 16,5 ettari con l'esclusione di alcune zone ad accesso limitato, vedi Fig. 1). Le caditoie sono state classificate 'negative', se secche o con acqua corrente, 'attive', se con acqua stagnante, 'positive', se caditoie attive con presenza di larve di Culicidi. La presenza/assenza di larve in una caditoia è stata determinata effettuando prelievi di acqua con un mestolo da 100 ml. Il calcolo del numero minimo di pescate necessarie per mettere in evidenza con una probabilità del 95% la presenza di almeno una larva in un focolaio 'positivo' è stato calcolato in base ad un modello statistico che tiene conto dello stato di aggregazione spaziale delle larve presenti e della loro densità media (Pitcairn et al., 1994; Pombi e Costantini, in preparazione). Le

caditoie 'attive' sono state monitorate attraverso controlli quotidiani per circa tre mesi per valutare la stabilità del volume d'acqua in esse contenuto; le caditoie che hanno mantenuto condizioni adatte ad un ciclo completo di sviluppo larvale, compreso tra 5 e 10 giorni a 25°C (Hawley, 1988), sono state scelte per l'esperimento sulla persistenza del temephos (*vide infra*). I dati ottenuti dal campionamento in una caditoia di controllo (n. 5 nella Fig. 1), impiegata nella valutazione della persistenza del temephos, sono stati utilizzati per l'analisi della dinamica di popolazione larvale, grazie all'abbondante presenza di larve di Culicidi durante tutto il periodo della sperimentazione (dal 16 agosto al 9 dicembre 2000).

Persistenza del temephos

La valutazione della persistenza dell'effetto larvicida è stata effettuata tra la fine di settembre e la prima metà di dicembre 2000 in 5 caditoie positive (Fig. 1), tre delle quali (nn. 1, 2, 4) sono state trattate con temephos mentre due (nn. 3, 5) sono state utilizzate come controlli. È stata utilizzata una micro-emulsione di temephos al 95% in acqua (Tambro 500®, I.N.D.I.A. Industrie Chimiche S.p.A.). In ogni caditoia è stata versata una dose standard di 150 ml di soluzione di temephos alla concentrazione di 10 mg/l. Dopo il trattamento tutte le caditoie sono state controllate ogni due giorni per verificare l'eventuale presenza di larve vive di Culicidi. Ad ogni controllo è stato calcolato il volume d'acqua presente in ciascuna caditoia e, in funzione di questo, è stato eseguito il numero di pescate minime. Il temephos non impedisce la schiusa delle uova, ma agisce solo sulle larve, quindi si è considerato esaurito l'effetto larvicida quando venivano rinvenute larve vive di stadio superiore al primo. In questo caso, la caditoia è stata considerata positiva e si è proceduto dunque ad un nuovo trattamento. Le larve vive raccolte sono state fissate in etanolo al 70% e trasportate in laboratorio per essere identificate con un microscopio stereoscopico e classificate per specie e per stadio (Romi et al., 1997). La presenza di larve di stadio superiore al primo nelle caditoie trattate è stata codificata in forma binaria ponendo pari a 1 le caditoie positive e pari a 0 quelle negative. La proporzione p di caditoie positive è conforme ad una distribuzione di frequenza di Bernoulli, che rappresenta una versione speciale della più generale distribuzione binomiale quando il numero di saggi è pari a 1. Per valutare quantitativamente la relazione esistente tra il periodo di tempo intercorrente tra i trattamenti delle caditoie e la frequenza degli eventi positivi di ricolonizzazione, l'analisi statistica ha quindi seguito le medesime procedure descritte per i dati dei biosaggi sulla sensibilità al temephos (vedi sopra). La proporzione p è stata trasformata nella scala logit e messa in relazione al numero di giorni post-trattamento secondo una regressione lineare, assumendo una struttura degli errori binomiale.

Risultati

Sensibilità al temephos

La Fig. 2 riporta i valori di mortalità ottenuti in funzione della dose testata e la curva logistica calcolata sulla base di questi valori. La retta di regressione logistica ha un coefficiente angolare pari a 251,0 (ES=16,7) ed una intercetta pari a -3,416 (ES=0,240). A partire da questi parametri, le CL_{50} e CL_{90} sono state stimate rispettivamente a 0,014 mg/l (limiti fiduciali al 95% 0,013 e 0,015) ed a 0,022 mg/l.

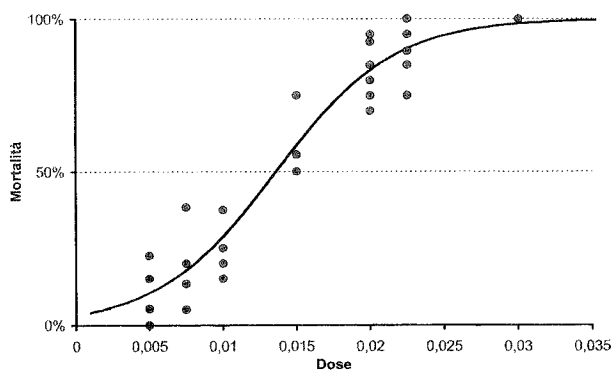


Fig. 2. Sensibilità delle larve di *Aedes albopictus* al temephos in laboratorio. La curva rappresenta la funzione logistica di mortalità in risposta alla concentrazione di temephos (in mg/l) stimata in base ai dati sperimentali (punti nel grafico).

Monitoraggio della popolazione immaginale

La Fig. 3 riporta i risultati del monitoraggio sulla presenza nel Bioparco di femmine gonotroficamente attive dal 9 settembre al 18 dicembre. La percentuale di ovitrappele positive si è mantenuta intorno a 100 fino a metà ottobre per poi diminuire gradualmente sino a dicembre, quando ha raggiunto valori compresi tra 0 e 25. Il numero medio di uova per ovitrappele positiva è cresciuto sino alla fine di

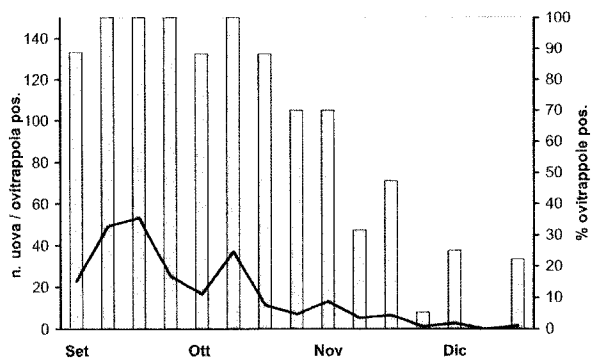


Fig. 3. Monitoraggio settimanale con ovitrappele della popolazione adulta di *Aedes albopictus* nel Bioparco. La linea rappresenta il numero medio di uova per ovitrappele positiva, l'istogramma rappresenta la percentuale di ovitrappele positive.

settembre (da 23 a 53 uova); successivamente, si è osservato un calo con un unico picco secondario (37 uova) a metà ottobre. Da questo momento il numero medio di uova per ovitrappele positiva si è mantenuto a valori compresi tra 6 e 13 fino al 20 novembre, per calare poi a valori prossimi a 0 al termine del periodo di monitoraggio. Nel complesso quindi, questi dati indicano un elevato livello di infestazione nel Bioparco almeno sino all'inizio di novembre, coerentemente con i dati per il II Municipio riportati in Di Luca *et al.* (2001).

Censimento delle caditoie e dinamica della popolazione larvale

La Fig. 1 mostra la distribuzione delle 243 caditoie censite nell'area del Bioparco, pari ad una densità di 15,2 caditoie per ettaro. Di queste, 218 (89,7% delle caditoie totali) sono state classificate come 'negative' e le restanti 25 (10,3%) come 'attive'; in 8 di queste ultime (3,5%) sono state raccolte larve di Culicidi. Durante il periodo di campionamento, *Culex pipiens* è risultato presente in tutte le 8 caditoie, *Culiseta longiareolata* in 6, ed *Ae. albopictus* in 3.

L'analisi longitudinale delle frequenze relative e delle densità larvali (esprese come media del numero di larve per pescata) nel focolaio utilizzato come controllo durante gli esperimenti sulla persistenza dell'effetto larvicida del temephos ha mostrato oscillazioni generalmente sincrone e rapporti tra le specie stabili, almeno dalla metà di settembre all'inizio di novembre. *Ae. albopictus* ha sempre presentato i valori di densità più bassi (compresi tra 0 e 1,3), mentre *Cx pipiens* ha mostrato valori compresi tra 0 e 33,2, e *Cs. longiareolata* tra 0 e 22,7.

Persistenza del temephos nelle caditoie

Per valutare la persistenza dell'effetto larvicida nelle caditoie trattate con temephos sono stati considerati esclusivamente i dati raccolti sino a metà novembre, in quanto a partire da questo momento le popolazioni larvale e adulta di *Ae. albopictus* sono decresciute monotonicamente (Figg. 3 e 4). La presenza di un numero di larve elevato nelle caditoie controllo è, infatti, condizione necessaria per poter ragionevolmente attribuire al solo trattamento (e non a fluttuazioni indipendenti della popolazione) l'eventuale mancanza di larve nelle caditoie trattate.

La curva di Fig. 5, che definisce la proporzione di tombini positivi in funzione del numero di giorni post-trattamento con la dose applicata di temephos, è stata stimata in base ai parametri della regressione logistica binaria pari a -4,292 (ES=1,262) per l'intercetta e 0,235 (ES=0,071) per il coefficiente angolare. Secondo tale curva, ad esempio, a frequenze di positività del 10% e del 50% corrispondono rispettivamente valori di 9 e 18 giorni. Da questi dati si evince che, dopo 9 giorni dal trattamento effettuato, il 10% delle caditoie sarebbero ridiventate focolai capaci di ospitare larve di *Ae. albopictus*.

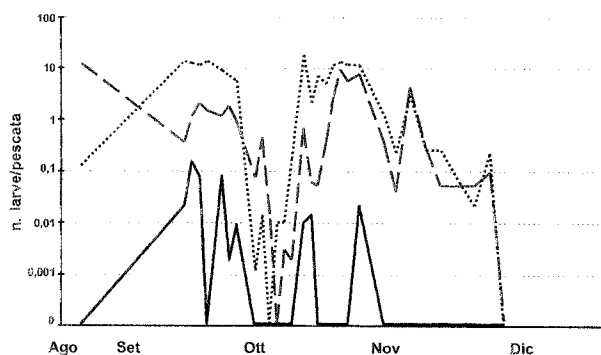


Fig. 4. Andamento temporale delle densità larvali di *Ae. albopictus* (linea continua), *Cx pipiens* (linea punteggiata) e *Cs. longiareolata* (linea tratteggiata) in una caditoia stradale utilizzata come controllo durante il periodo di studio.

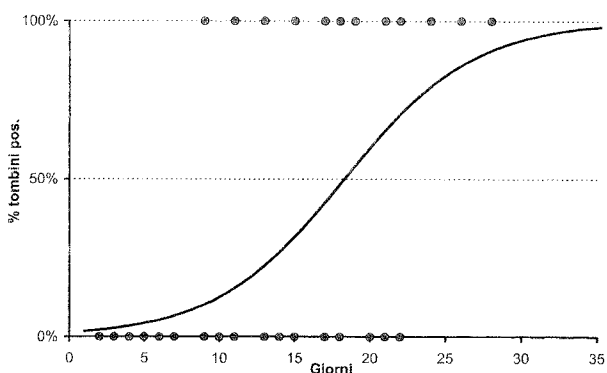


Fig. 5. Curva logistica che descrive la proporzione di caditoie ricolonizzate in funzione del numero di giorni post-trattamento con la dose sperimentale di temephos. I punti rappresentano i dati sperimentali di una variabile binaria che assume il valore 0 quando la caditoia è negativa e 1 quando è positiva per almeno una larva di II stadio (punti nel grafico).

Discussione

I dati sulla sensibilità al temephos delle larve di *Ae. albopictus* dimostrano che le concentrazioni letali, pur essendo leggermente superiori a quelle riportate in letteratura (per esempio $CL_{50}=0,010$ mg/l in Ali *et al.*, 1995), non risultano tali da considerare la popolazione romana resistente, come riportato per popolazioni di *Ae. albopictus* degli Stati Uniti (Sweeney, 1993; Ali *et al.*, 1995). I nostri dati mostrano inoltre che la sensibilità al temephos della popolazione romana è inferiore di solo 2 volte rispetto a quella del ceppo di riferimento SABAH (Sweeney, 1990). Il temephos, dunque, rimane un principio attivo efficace che può essere utilizzato quale larvicida nell'ambito di campagne di controllo contro questa zanzara. Tuttavia, lo studio sulla persistenza dell'effetto larvicida del temephos ha mostrato che il 10% delle caditoie è positivo per la presenza di larve di Culicidi già dopo 9 giorni dal trattamento, e dopo 30 giorni il 90% delle caditoie

risulta positivo. Da questi risultati si può inferire che per evitare che il ciclo larvale si completi nell'intervallo di tempo compreso tra due trattamenti, è necessario che questo non superi due settimane, confermando quanto già precedentemente suggerito da altri autori (Di Luca *et al.*, 2000). Bisogna d'altra parte notare che è possibile adattare la lunghezza dell'intervallo tra trattamenti successivi in rapporto alla stagione, in quanto la lunghezza del ciclo larvale è funzione della temperatura ambientale (Hawley, 1988).

Il censimento delle caditoie presenti nel Bioparco ha evidenziato come ad una densità elevata di potenziali luoghi di sviluppo non corrisponda necessariamente un numero di siti effettivamente produttivi per *Ae. albopictus*, in quanto questa specie è stata trovata soltanto nell'1,2% delle 243 caditoie censite. Inoltre, le densità larvali di *Ae. albopictus* nelle caditoie sono state molto inferiori rispetto a quelle delle altre due specie di Culicidi con cui condivide questo habitat larvale, in particolare se paragonate alle densità di *Cx pipiens*. Una possibile spiegazione è che *Cx pipiens* abbia una migliore capacità di adattarsi a focolai con forte carica organica, quali le caditoie stradali. Questa ipotesi è plausibile se si considera che *Cx pipiens molestus* è una specie ben adattata all'ambiente urbano, mentre *Ae. albopictus* è originaria di zone di foresta tropicale dove si sviluppa in focolai con acque più povere in carica organica, e si è adattata ad ambienti urbani solo di recente (Hawley, 1988; Romi, 1999). Un'ipotesi alternativa è che le densità larvali osservate nelle caditoie rispecchino le maggiori densità di *Cx pipiens*; quest'ipotesi dovrebbe venire testata monitorando le frequenze relative degli adulti di queste due specie. L'indice di abbondanza relativo degli adulti di *Ae. albopictus* presenti durante la stagione riproduttiva nell'area del Bioparco, ottenuto per campionamento con ovitrappole, ha tuttavia dimostrato un alto livello di infestazione in quest'area, confermando i dati sull'abbondanza relativa di questa specie nel II Municipio di Roma, che è tra le zone più infestate di questo Comune (Di Luca *et al.*, 2001). Sembra dunque ragionevole ipotizzare che in questo ambiente caratterizzato da frequenti siti di sviluppo larvale alternativi, le caditoie stradali rappresentino per *Ae. albopictus* un habitat larvale secondario; questa specie è ben nota per la capacità di colonizzare qualsiasi tipo di contenitore d'acqua di piccole dimensioni, dalle cavità d'albero ai sottovasi (Hawley, 1988). Queste osservazioni preliminari effettuate nell'area del Bioparco di Roma sottolineano la necessità di studi più approfonditi per stabilire l'importanza relativa di diverse categorie di focolai larvali in relazione alle caratteristiche ambientali di aree urbane, al fine di identificare i siti di sviluppo più produttivi per ottimizzare l'efficacia dei trattamenti larvicidi e minimizzare i costi degli interventi di controllo, che attualmente sono limitati in molti casi a bersagli di produttività relativa ignota, quali le caditoie stradali di aree pubbliche.

Ringraziamenti

Si ringraziano Fulvio Fraticelli, la Bioparco S.p.A., il Dott. Domenico Tudini e la SANAMA S.r.l. per la cortese collaborazione. Si ringrazia inoltre il Dott. Andrea Baseggio e la I.N.D.I.A. Industrie Chimiche S.p.A. per avere fornito i campioni d'insetticida utilizzati durante la sperimentazione.

Riferimenti bibliografici

- Ali A *et al* (1995). Comparative toxicity of selected larvicides and insect growth regulators to a Florida laboratory population of *Aedes albopictus*. *J Am Mosq Control Assoc* 11: 72-76.
- Cancrini G *et al* (1995). Development of *Dirofilaria* and *Setaria* nematodes in *Aedes albopictus*. *Parassitologia* 37: 141-145.
- Collett D (1991). Modelling binary data. Chapman & Hall/CRC Press.
- Di Luca M *et al* (2000). Guida per la sorveglianza e il controllo della zanzara "tigre" *Aedes albopictus*. Comune di Roma, Dip X Politiche Ambientali e Agricole. Istituto Superiore di Sanità. Lab di Parassitologia.
- Di Luca M *et al* (2001). *Aedes albopictus* a Roma: monitoraggio nel triennio 1998-2000. *Ann Ist Super Sanita* 37: 249-254.
- Hawley WA (1988). The biology of *Aedes albopictus*. *J Am Mosq Control Assoc*, Suppl 1: 1-39.
- Lai CH *et al* (2001). Susceptibility of mosquitoes in central Taiwan to natural infections of *Dirofilaria immitis*. *Med Vet Entomol* 15: 64-67.
- Mitchell CJ (1991). Vector competence of North and South American strains of *Aedes albopictus* for certain arboviruses: a review. *J Am Mosq Control Assoc* 7: 446-451.
- Mitchell CJ (1995). The role of *Aedes albopictus* as an arbovirus vector. *Parassitologia* 37: 109-113.
- Payne CD (1987). The GLIM® system release 3.77 manual. Numerical Algorithms Group Ltd.
- Pitcairn MJ *et al* (1994). Spatial patterns of *Anopheles freeborni* and *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae) larvae in California rice fields. *J Med Entomol* 31: 545-553.
- Romi R *et al* (1997). Le zanzare italiane: generalità e identificazione degli stadi preimaginali (Diptera: Culicidae). *Fragmenta Entomologica* XXIX, Suppl.
- Romi R (1999). *Aedes albopictus* in Italia: implicazioni sanitarie a dieci anni dalla prima segnalazione. *G Ital Med Trop* 4: 69-73.
- Romi R (2001). *Aedes albopictus* in Italia: un problema sanitario sottovalutato. *Ann Ist Sup Sanita* 37: 241-247.
- Sabatini A *et al* (1990). *Aedes albopictus* in Italia e possibile diffusione della specie nell'area mediterranea. *Parassitologia* 32: 301-304.
- Service MW (1993). Mosquito ecology, Field sampling methods. Elsevier Applied Science.
- Sweeney KJ (1990). Insecticide susceptibility testing of Maryland mosquitoes, 1990. Annual Report, Maryland Department of Agriculture.
- Sweeney KJ (1993). Organophosphorous insecticide susceptibility of mosquitoes in Maryland, 1985-89. *J Am Mosq Control Assoc* 9: 8-12.
- WHO (1981). Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticide. (WHO/VBC/81.807). World Health Organization, Geneva.